

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra antropologie a genetiky člověka



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Využití metody paralelního sekvenování při stanovování
zešikmení X inaktivace**

Use of massive parallel sequencing in determination of skewed X inactivation

Bc. Tereza Veselková

Školitelka: RNDr. Lenka Dvořáková, CSc

Praha 2016

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci s názvem „Využití metody paralelního sekvenování při stanovování zešíkmení X inaktivace“ zpracovala samostatně pod vedením mé školitelky RNDr. Lenky Dvořákové, CSc a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....

Tereza Veselková

V první řadě bych chtěla poděkovat mé školitelce RNDr. Lence Dvořákové, CSc za věnovaný čas, podnětné připomínky a podporu. Dále pak Mgr. Martinu Řebounovi za poskytnutí dat z paralelního sekvenování a celému kolektivu Laboratoře DNA diagnostiky ÚDMP za jejich ochotu a přívětivost. Za věnovaný čas a cenné konzultace bych ráda poděkovala také RNDr. Pavlíně Daňkové, Ph.D. a doc. Mgr. Vladimíru Sládkovi, Ph.D. V neposlední řadě bych ráda poděkovala celé mé rodině a přátelům, bez jejichž podpory a trpělivosti by mě studium nebylo možné.

Abstrakt

Zešíkmení inaktivace chromozomu X je často studováno v souvislosti s projevy X-vázaných onemocnění u žen, přičemž u většiny chorob není vliv míry zešíkmení na fenotyp zcela objasněn. Převážná část studií pro určení poměru inaktivace chromozomů X využívá metody založené na methylačně senzitivní restrikci, nejčastěji konkrétně metodu HUMARA, která vychází z profilu methylace v genu *AR*. Nicméně tento způsob testování má některé své nevýhody, a proto jsou stále hledány nové metodické přístupy.

V naší práci jsme ve skupině 54 žen stanovovali míru zešíkmení X inaktivace z DNA izolované z krevních buněk a v některých případech také z buklálních stěrů pomocí methylačně senzitivní restrikce v lokusech *AR*, *CNKSR2* a *RP2*. U 32 z těchto žen, u nichž bylo možné z krve izolovat celkovou RNA, jsme využili též metodu, která je založena na kvantifikaci transkriptu pomocí paralelního sekvenování, přičemž k analýze jsme použili polymorfismy *LAMP2* c.156A>T, *IDS* c.438C>T a *ABCD1* c.1548G>A.

Nejvíce informativní metodou v námi studované skupině byla methylačně senzitivní restrikce v lokusu *RP2* (71 %), a to i díky malému počtu „stutter“ vrcholů vznikajících při PCR. Přibližně stejné množství žen (69 %) bylo informativních v lokusu *AR*. Při porovnání výsledků těchto dvou metod jsme však v některých případech zaznamenali rozdíly přesahující až hodnotu 10 %. Podobně i při srovnání s hodnotami získanými metodou kvantifikující transkript pomocí jednotlivých polymorfismů (které vykazovaly též poměrně vysokou informativnost v rozmezí 40 – 62 %), byly výsledky zpravidla ve velmi dobré shodě, nicméně i zde se u několika žen stanovené hodnoty výrazně lišily. Interval shody použitých metod vymezené pro námi studovanou skupinu tak měly u většiny porovnání rozsah okolo 20 %. Předpokládáme, že hlavní příčinou pozorovaných rozdílů jsou nepřesnosti v měření, které se projevíly při stanovení koeficientu opakovatelnosti, přičemž se zdá, že metoda využívající paralelní sekvenování poskytuje reprodukovatelnější výsledky než analýza založená na methylačně senzitivní restrikci.

Metoda paralelního sekvenování je tedy na základě našich závěrů vhodná ke stanovení míry zešíkmení X inaktivace ve výzkumu i klinické praxi. Pro spolehlivé určení poměru inaktivace

chromozomů X však pro všechny metody doporučujeme vycházet alespoň ze dvou měření a v ideálním případě stanovení opakovat různými metodami.

Klíčová slova: inaktivace chromozomu X, zešíkmení X inaktivace, HUMARA, paralelní sekvenování

Abstract

Skewed X chromosome inactivation has been often studied as a possible factor that influences manifestation of X-linked diseases in heterozygous women. Yet the association between phenotype and degree of skewing stays unclear for most disorders. Current works rely mostly on methods that are based on methyl-sensitive restriction while determining the X inactivation pattern and mainly the HUMARA assay which investigates the methylation profile in the *AR* gene. However those methods have some known disadvantages and therefore we are still seeking new methodical approaches.

We used DNA isolated from whole blood and in some cases also buccal swabs to assess X inactivation patterns in 54 women using methylation-based methods for loci *AR*, *CNKS2* and *RP2*. Transcription-based assay was utilized to evaluate skewing of X inactivation in 32 of those women, whose samples were available for RNA extraction, using massive parallel sequencing and polymorphisms *LAMP2* c.156A>T, *IDS* c.438C>T and *ABCD1* c.1548G>A.

Partly thanks to almost no stuttering during PCR the *RP2* locus was the most informative in our study (71 % of women) and approximately the same number of women (69 %) were informative for the HUMARA assay. However when comparing the results of those two methods we determined difference greater than 10 % in several cases. Similarly the X inactivation patterns assessed with the transcript-based method (which was informative for 40 – 62 % of women in our group depending on individual polymorphism) were in most cases in a very good agreement with those obtained by methylation based assay although they also differed significantly in some cases. Therefore the agreement intervals were about 20 % wide for comparison of most of the methods we used. Based on determined coefficients of repeatability we assume that inaccuracy of measurement was the main cause of observed differences and it seems that the parallel sequencing method provides more reproducible results than assays based on methyl-sensitive restriction.

Based on our observation we consider the transcript quantifying method suitable for evaluation of X inactivation pattern in research and clinical use. However we also recommend using repeated measurements and combination of two or more methods to obtain the best results.

Keywords: chromosome X inactivation, skewed X inactivation, HUMARA, massive parallel sequencing

Obsah

1	Úvod.....	10
1.1	Inaktivace chromozomu X	10
1.1.1	Evoluce a kompenzace genové dávky	10
1.1.2	Podstata X inaktivace.....	11
1.1.3	Počátek X inaktivace	12
1.1.4	Geny unikající inaktivaci	12
1.1.5	Molekulární mechanismy	14
1.1.6	Heterochromatin Xi	17
1.2	Zešíkmení X inaktivace.....	18
1.2.1	Obecná charakteristika.....	18
1.2.2	Zešíkmení X inaktivace v různých tkáních.....	19
1.2.3	Zešíkmení X inaktivace a věk.....	20
1.2.4	Zešíkmení X inaktivace a onemocnění	21
1.3	Metody stanovení zešíkmení X inaktivace	23
1.3.1	Methylačně senzitivní restrikce DNA.....	23
1.3.2	Nedostatky metod založených na restrikci	25
1.3.3	Kvantifikace transkriptu	26
1.3.4	Využití paralelního sekvenování	28
1.3.5	Další metody	28
2	Hypotézy a cíle	30
3	Materiál a metody	31
3.1	Soubor osob.....	31
3.2	Izolace DNA.....	31

3.2.1	Izolace DNA z krve	31
3.2.2	Izolace DNA z bukalního stěru.....	34
3.3	Methylačně senzitivní analýza	35
3.3.1	Methylačně senzitivní restrikce	35
3.3.2	PCR a fragmentační analýza.....	39
3.3.3	Vyhodnocení výsledků	43
3.4	Kvantifikace transkriptu pomocí paralelního sekvenování	44
3.5	Statistické zpracování.....	45
4	Výsledky	46
4.1	Metody založené na methylačně senzitivní restrikci	46
4.1.1	Optimalizace	46
4.1.2	Informativnost a chybovost při amplifikaci	48
4.1.3	Crossing-over.....	49
4.2	Porovnání metod	51
4.2.1	Opakovatelnost	51
4.2.2	Metody založené na methylačně senzitivní restrikci	51
4.2.3	Analýza transkriptu a methylace v lokusech <i>AR</i> a <i>RP2</i>	54
4.3	Rozložení poměrů inaktivace chromozomů X	59
5	Diskuze	60
6	Závěr	65
7	Seznam zkratk	67
8	Seznam literatury	69
8	Přílohy.....	82

1 Úvod

1.1 Inaktivace chromozomu X

Na genetické úrovni jsou muž a žena definováni odlišnou skladbou pohlavních chromozomů. Zatímco ženy, jako homogametické pohlaví, mají dva chromozomy X, muži jsou charakterizováni přítomností chromozomu Y, v běžném stavu tedy sestavou gonozomů XY. X-vázané geny se tudíž u žen nacházejí v dvounásobném množství oproti mužům a z tohoto důvodu dochází v buňkách žen k procesu, při němž je jeden z gonozomů inaktivován, k procesu X inaktivace.

Pozorování odlišností ve zbarvení samiček a samečků myši vedlo Mary F. Lyon k formulování myšlenky, že jeden z chromozomů X je u savců náhodně, tedy bez ohledu na maternální či paternální původ, inaktivován, čímž dochází k vyrovnání genové dávky mezi pohlavími. Tento inaktivovaný chromozom poté vytváří takzvaný sex chromatin neboli Barrovo tělísko, které je možné pozorovat ve světelném mikroskopu. Samičky jsou pak tedy ve výsledku mozaikami populací buněk exprimujících geny buď z otcovského či mateřského chromozomu (Lyon, 1961).

1.1.1 Evoluce a kompenzace genové dávky

Inaktivace chromozomu X se zdá být univerzálním způsobem, jakým dochází k vyrovnání genové dávky u savců. Mezi organismy s chromozomálně určeným pohlavím však nacházíme i odlišné mechanismy. Například u *Drosophily melanogaster* je zdvojnásobena exprese z chromozomu X u samců (Maroni et al., 1974), v případě *Ceanorhabditis elegans* je naopak exprese z obou X chromozomů u hermafroditů snížena na polovinu (Meyer et Casson, 1986). Nicméně u těchto bezobratlých je pohlaví určeno poměrem počtu přítomných chromozomů X k autozomům na rozdíl od savců, u nichž je rozhodující přítomnost chromozomu Y.

Mezi obratlovci jsou v otázce kompenzace genové dávky jednoznačně nejprozkoumanější skupinou savci, z pochopitelných důvodů konkrétně myš a člověk. I u ptáků však byly popsány rozdíly v expresi některých genů z chromozomu Z mezi samci a samicemi (Melamed et Arnold, 2007). Na rozdíl od X inaktivace savců se ale jedná o proces podstatně variabilnější a míra

exprese je v každém lokusu pravděpodobně nezávisle regulována (Livernois et al., 2013). U ptakopyska, který patří do savčí skupiny ptakořitní, se původně předpokládalo, že na svých pěti chromozomech X nese sekvence homologické jak k X placentálů, tak Z ptáků (Grutzner et al., 2004). Nicméně podle novějších prací sekvence homologní k X placentálů nalezneme u ptakořitných pouze na autozomech (Veyrunes et al., 2008). Také mechanismus kompenzace genové dávky připomíná spíše variabilní a neúplné umlčení exprese u ptáků, ovšem s tím rozdílem, že sousedící geny vykazují obdobnou míru exprese a transkripce je tak pravděpodobně alespoň částečně regulována na regionální úrovni (Livernois et al., 2013). Opravdovou inaktivaci jednoho z chromozomů X bychom tedy mohli pravděpodobně nalézt až u společného předka vačnatců a placentálů. Právě u skupiny vačnatci totiž můžeme u samic pozorovat expresi alel jen z jednoho, a to konkrétně maternálního, chromozomu X (X_m), přičemž molekulární mechanismy umlčující paternální chromozom (X_p) jsou alespoň částečně podobné těm u placentálních savců (Mahadevaiah et al., 2009).

Jak již bylo zmíněno výše, velká část výzkumů týkajících se X inaktivace byla a je prováděna na myších. Zejména s ohledem na to, že se tato práce týká genetiky člověka, je nutné podotknout, že podle aktuálních poznatků se X inaktivace myší liší od X inaktivace u lidí, a to v ohledech velmi významných jako je molekulární podstata, nástup a rozsah inaktivace (Chang et Brown, 2010; Yang et al., 2010; Okamoto et al., 2011) (podrobněji na toto téma v následující kapitole).

Výhradní inaktivace paternálního chromozomu vačnatců a níže zmíněná imprintovaná inaktivace X_p v trofoektodermu myší by současně s velkou podobností molekulárních procesů podporovaly myšlenku některých autorů o společném původu X inaktivace a autozomálního imprintingu savců, či dokonce o X inaktivaci jako hnací síle vzniku imprintingu (Lee, 2003; Reik et Lewis, 2005).

1.1.2 Podstata X inaktivace

Inaktivace chromozomu X je ve své podstatě soubor epigenetických modifikací, jimiž je umlčena exprese genů z takového počtu chromozomů X, aby právě jeden zůstal aktivní. Za běžných podmínek tedy v buňkách ženy nalezneme jeden inaktivovaný (X_i) a jeden aktivní (X_a)

chromozom X. Inaktivovaný chromozom je vybírán náhodně a k celému procesu dochází během embryogeneze, přičemž od chvíle, kdy je X inaktivace nastolena, dědí dceřiné buňky informaci, o tom který z chromozomů má být inaktivován, od buňky mateřské (Lyon, 1962).

1.1.3 Počátek X inaktivace

Přesné načasování počátku inaktivace u člověka stále není zcela známo. Poznatky zjištěné při studiích na myších modelech nejsou v případě této otázky aplikovatelné, neboť na rozdíl od člověka u myši dochází k imprintované inaktivaci paternálního chromozomu X (Okamoto et al., 2011). V preimplantačním stádiu dochází u myších embryí ke globální inaktivaci Xp, která se nadále udržuje v buňkách tkání trofoektodermu. Oproti tomu během růstu vnitřní masy buněk se inaktivace Xp v této části embrya nezachovává a v zahnížděném embryu již můžeme pozorovat inaktivaci náhodnou (Okamoto et al., 2004). Takováto imprintovaná inaktivace X chromozomu nebyla u člověka pozorována a v lidské placentě bylo prokázáno náhodné rozložení inaktivace Xm a Xp (Moreira de Mello et al., 2010).

V případě lidských embryí sice byly pozorovány počátky inaktivace již ve stádiu osmi buněk (van den Berg et al., 2009), nicméně tato práce je v rozporu s výsledky jiných autorů, při jejichž experimentech nebyl ani jeden z X chromozomů v preimplantačních embryích umlčen (Okamoto et al., 2011). Jednou z potenciálních příčin těchto rozdílů je možnost, že u lidských embryonálních kmenových buněk kultivovaných při atmosférické koncentraci kyslíku může docházet k překotné inaktivaci chromozomu X, což by svědčilo ve prospěch hypotézy o pozdějším nástupu inaktivace u lidí (Lengner et al., 2010).

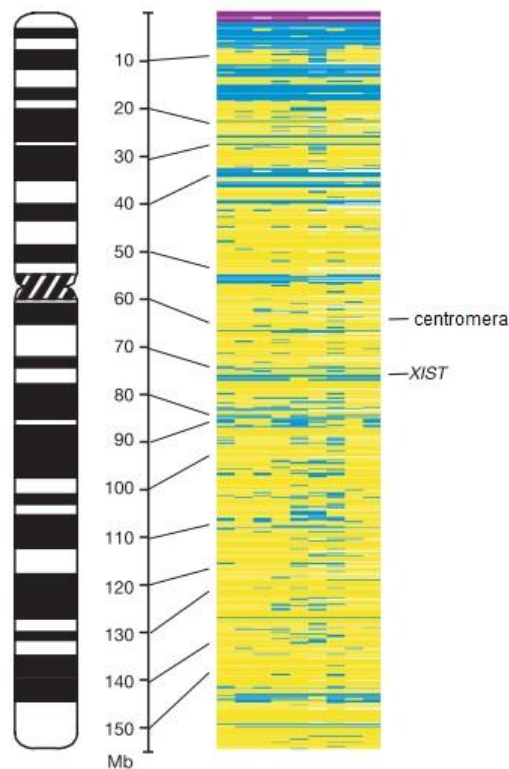
1.1.4 Geny unikající inaktivaci

Za předpokladu, že v buňkách se vždy nachází jen jeden aktivní chromozom X, se nám nabízí otázka, co je příčinou syndromů spojených s aneuploidií gonozomů. Žena nesoucí pouze jeden chromozom X (tedy žena s Turnerovým syndromem a karyotypem 45,X) by teoreticky měla X-vázané geny exprimovat ve stejné míře jako žena s jedním aktivním a jedním inaktivovaným chromozomem, přesto se u těchto žen projevuje celá řada patologií a 45,X embrya jsou

v převážné míře potrácena během těhotenství (Hook et al., 1983). Postižení spojená s Turnerovým syndromem by vysvětloval předpoklad, že inaktivace chromozomu X není úplná a některé geny jí unikají (Ferguson-Smith, 1965), přičemž exprese některých genů z Xi byla později opravdu prokázána (Shapiro et al., 1979).

Podle současných poznatků uniká inaktivaci z chromozomu X u člověka celých 15 % genů a nejméně dalších 10 % uniká variabilně v některých buňkách (Carrel et Willard, 2005) (obrázek 1). Pro srovnání u myši byl tento jev pozorován jen u 3 % genů (Yang et al., 2010). V lidských buňkách se unikající geny typicky vyskytují ve shlucích a podstatně více na krátkém raménku než na dlouhém raménku chromozomu X, což zřejmě souvisí s mladším autozomálním původem krátkého raménka (Spencer et al., 1991; Carrel et Willard, 2005). Geny unikající nalezneme v největší míře v pseudoautozomální části (PAR) právě krátkého raménka chromozomu, tedy v oblasti homologní a schopné se párovat s PAR chromozomu Y (Cooke et al., 1985). Původně se předpokládalo, že i ostatní geny unikající inaktivaci mají své homology na chromozomu Y (Jegalian et Page, 1998), nicméně z Xi byla prokázána exprese i těch genů, které se vyskytují pouze na chromozomu X a ani v jejich blízkosti se žádný gen s homologem na Y nenachází (Carrel et Willard, 2005).

Na základě práce autorů Cotton a kolektiv lze předpokládat individuální rozdíly v úniku X inaktivaci u jednotlivých genů a případně i v míře exprese z Xi mezi ženami v populaci a vyloučit nelze ani závislost na konkrétním typu tkáně (Cotton et al., 2013). Tkáňově specifický únik X inaktivaci některých genů by taktéž podporovaly výsledky *in vivo* studie myšního modelu (Berletch et al., 2015).



Obr. 1: Geny unikající inaktivaci; fialově jsou znázorněny geny v PAR, modře geny exprimované z Xi, žlutě inaktivované geny

(Upraveno podle: Carrel et Willard, 2005)

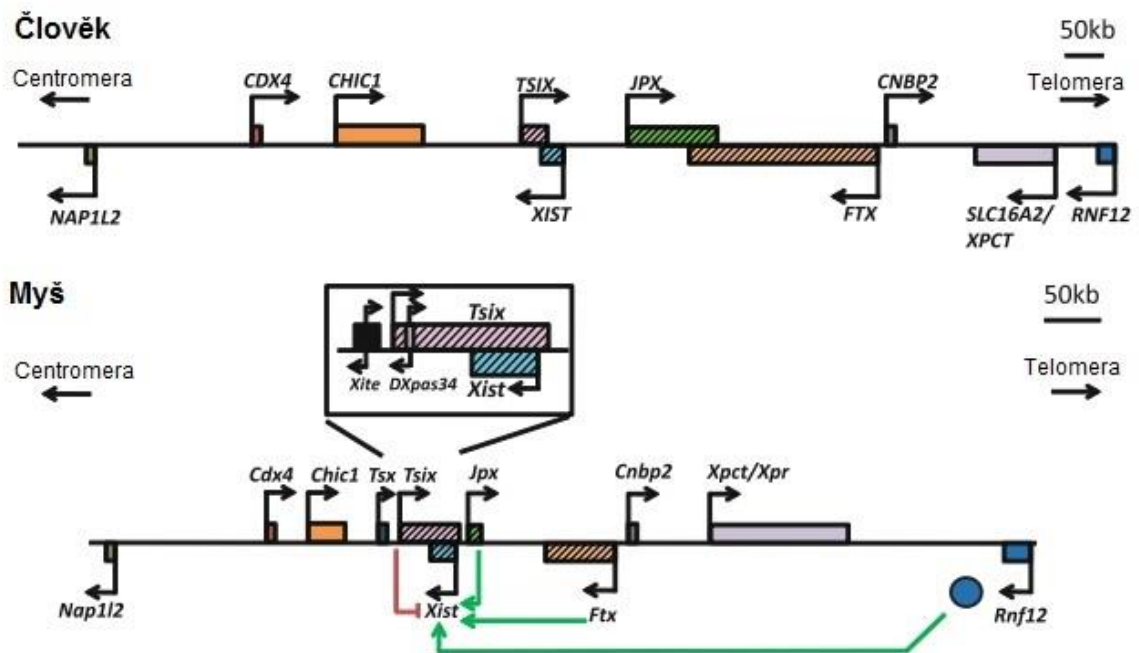
1.1.5 Molekulární mechanismy

Na zahájení a průběhu inaktivace jednoho z chromozomů X se podílí celá řada mechanismů, přičemž mnoho z nich nějak souvisí či má svůj původ v oblasti takzvaného X inaktivačního centra (*XIC* u lidí a *Xic* u myši). Přítomnost této oblasti lokalizované do regionu Xq13 je pro X inaktivaci nezbytná (Rastan et Robertson, 1985; Brown et al., 1991). Nejvíce prozkoumanou molekulou transkribovanou právě z *XIC* je 17 kb dlouhá nekódující ribonukleová kyselina (RNA) s názvem *XIST* (Brown et al., 1992). Tato RNA je transkribována z Xi a poté zůstává v jádře, kde velmi úzce asociuje s inaktivním chromozomem (Clemson et al., 1996). Jako výsledek pozorování *Xist* transkriptu v myších buňkách byl navržen model, kdy šíření *Xist* po X vyvolává modifikace chromatinu a architektury chromozomu vedoucí k inaktivaci (Engreitz et al., 2013). V lidských buňkách je přítomnost *XIST* lokusu nezbytná pro vlastní iniciaci

X inaktivace (Hall et al., 2002), nicméně zřejmě není nutná pro udržení inaktivního stavu Xi poté, co je nastolen (Brown et Willard, 1994).

Pro přežití buňky je nutné zajistit, aby *XIST/Xist* nebyl exprimován z chromozomu X, který má zůstat aktivní. Právě tuto funkci u myši zajišťuje další dlouhá nekódující RNA transkribovaná z *Xic*, *Tsix*. *Tsix* je 40 kb dlouhý nepřekládaný antisense transkript *Xist*, který je po započetí inaktivace exprimován pouze z Xa (Lee et al., 1999). Exprese *Tsix* vede k modifikaci chromatinu v lokusu *Xist* na stejném chromozomu, a tudíž umlčení exprese tohoto genu na Xa (Sado et al., 2005). Popsán byl též lidský homolog *Tsix*, *TSIX*. U člověka je však tento gen výrazně zkrácen na 5' konci a je tak antisense transkriptem *XIST* jen z velmi malé části (Migeon et al., 2001). Pozorování též prokázala, že v lidských buňkách je *TSIX* exprimován z Xi a nikoliv z Xa, jak je tomu u myši, a není schopen umlčet expresi *XIST*. Je tedy možné, že se jedná jen o defektní pozůstatek genu bez specifické funkce (Migeon et al., 2002). Poměrně novým kandidátem na molekulu udržující jeden z X chromozomů aktivní je v roce 2013 popsána RNA *XACT*, která je přepisována z lokusu Xq23. Tento transkript asociuje s Xa v lidských embryonálních kmenových buňkách podobně jako *XIST* s Xi. Podle autorů Vallot a kolektiv je navíc v buňkách, které nepřekládají *XIST* ani z jednoho chromozomu, *XACT* transkribován z obou alel (Vallot et al., 2013). Lze tedy předpokládat, že tyto RNA jsou u člověka v úzké funkční vazbě.

Několik dalších molekul bylo popsáno jako významné faktory ovlivňující průběh inaktivace u myši. Vzhledem k již výše zmíněným odlišnostem a i rozdílům ve struktuře X inaktivačních center (obrázek 2) však není jisté, nakolik lze tyto poznatky zobecňovat a aplikovat na průběh X inaktivace u lidí. Mezi tyto molekuly patří další dvě nekódující RNA, *Jpx* a *Ftx*, jejichž geny leží v oblasti *Xic* a které působí jako aktivátory *Xist* (Tian et al., 2010; Chureau et al., 2011). Podobně E3 ubiquitin ligáza, RNF12, je nezbytná pro průběh X inaktivace a aktivuje promotor *Xist* (Barakat et al., 2011). Významem RNF12 však nemusí být jen prostá regulace exprese *Xist*, neboť počet genů *Rnf12* v buňce ovlivňuje množství inaktivovaných chromozomů. Tento fakt činí, v *trans* působící a mimo *Xic* ležící, *Rnf12* kandidátem na gen s významnou rolí v takzvaném procesu počítání, kterým je zajištěno, aby vždy právě jeden X chromozom zůstal v buňce aktivní (Monkhorst et al., 2008; Jonkers et al., 2009). Společně s v *cis* působícími *Jpx* a *Ftx* tak zajišťují robustní podklad počátku X inaktivace (Barakat et al., 2014).



Obr. 2: Struktura X inaktivačního centra člověka a myši; na myším *Xic* zelenými šipkami znázorněny aktivátory *Xist*, červenou linkou znázorněn represor *Xist*

(Upraveno podle: Yang et al., 2011)

Mnohokrát spekulován je význam dlouhých rozptýlených jaderných elementů (LINEs) pro průběh X inaktivace. Chromozom X je téměř z 30 % tvořen LINE-1 elementy, což je dvojnásobné množství oproti autozomům. Pozoruhodná je též akumulace těchto retrotranspozonů v okolí *XIC* a signifikantně vyšší výskyt v lokusech podléhajících inaktivaci oproti okolí genů, které inaktivaci unikají (Bailey et al., 2000). Toto pozorování by podporovalo hypotézu formulovanou Mary F. Lyon, podle které právě LINE-1 slouží na X jako jakési stanice, které umožňují šíření *Xist* a tedy inaktivace po chromozomu (Lyon, 1998). V novější studii však nebyla korelace mezi lokalizací *Xist* na chromozomu a přítomností LINE-1 pozorována (Engreitz et al., 2013). Tento fakt nicméně nevylučuje možnost, že přítomnost LINE elementů může mít vliv na strukturní organizaci chromozomu a tak umožňovat šíření inaktivace (Tattermusch et Brockdorff, 2011).

1.1.6 Heterochromatin Xi

Chromatin inaktivovaného X v jádře zaujímá typickou strukturu a je pro něj charakteristická řada epigenetických modifikací. V interfázním jádře je Xi chromatin kondenzovaný a asociuje s jadernou membránou (Rego et al., 2008), přičemž nekódující sekvence bohaté na repetice se shlukují do centra chromozomového teritoria, zatímco na geny bohaté oblasti se, bez ohledu na transkripční aktivitu genů, vyskytují spíše na jeho povrchu (Clemson et al., 2006). Inaktivní chromozom se během S fáze replikuje podstatně později oproti aktivnímu X (Schmidt et Migeon, 1990). Takováto asynchronní replikace je typická i pro další transkripčně neaktivní a heterochromatinové oblasti (Woodfine et al., 2004). Možným vysvětlením tohoto fenoménu je vazba deoxyribonukleové kyseliny (DNA) na deacetylované histony při replikaci v pozdní S fázi (Zhang et al., 2002).

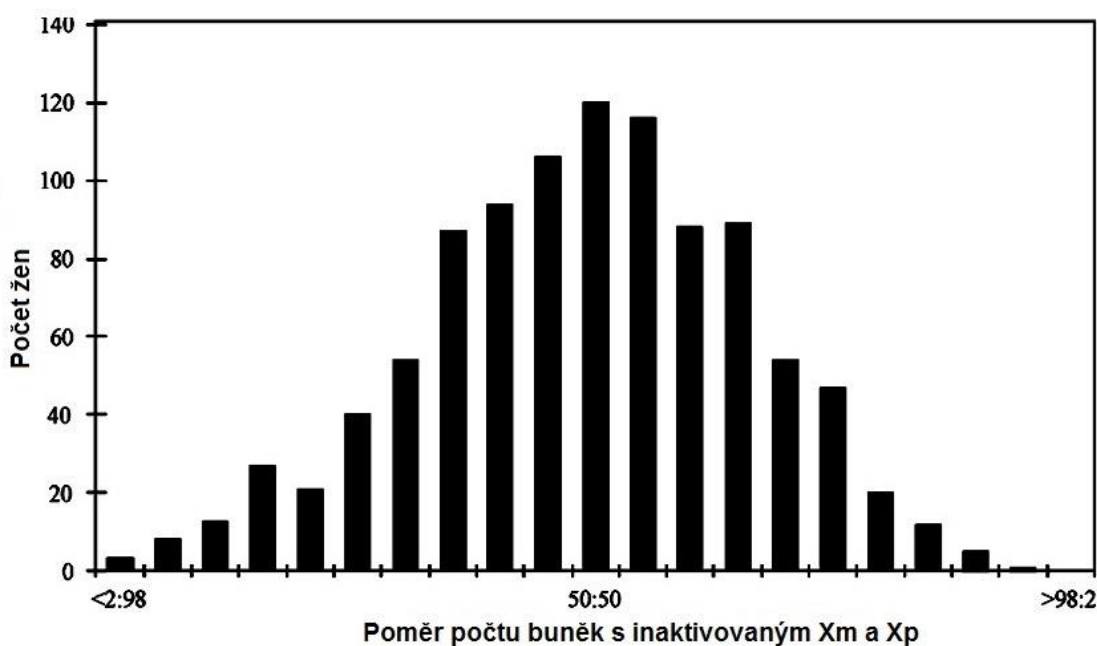
Významným činitelem při iniciaci a udržování X inaktivace jsou tedy též modifikace aminokyselin na N konci histonů a výskyt histonových variant. Již velmi brzo po počátku akumulace *Xist* RNA můžeme na Xi pozorovat zvýšené množství methylovaných H3K9 a H3K27 (Rougeulle et al., 2004), přičemž obě tyto modifikace patří mezi značky typické pro heterochromatin (Kouzarides, 2007). Jako pro inaktivní X charakteristické byly popsány též hypomethylace H3R17, H3K36, H3K4, hypoacetylace H4 a ubiquitinilace H2AK119 (Chaumeil et al., 2002; Fang et al., 2004). Typický je taktéž četný výskyt histonu macroH2A, nicméně význam akumulace této histonové varianty pro inaktivaci zatím není jasný (Costanzi et Pehrson, 1998; Chadwick et Willard, 2001).

Z pohledu této práce, která se zabývá zešíkmením X inaktivace a jeho stanovením je nejvýznamnějším typem epigenetické modifikace vyskytující se na Xi methylace DNA, neboť právě tu je možné využít pro zhodnocení poměru inaktivace X_m a X_p v buňkách jedince (Allen et al., 1992). Inaktivovaný chromozom má podstatně odlišný profil methylace od chromozomu aktivního, přičemž sekvence v promotorech umlčených genů jsou methylované, zatímco geny unikající inaktivaci tuto epigenetickou značku typicky postrádají (Sharp et al., 2011).

1.2 Zešíkmení X inaktivace

1.2.1 Obecná charakteristika

V současnosti uznávaným předpokladem je, že výběr, který z chromozomů X bude v buňce inaktivován, je u člověka naprosto náhodný a každý z přítomných chromozomů má stejnou šanci zůstat aktivní (Monkhorst et al., 2008). Z tohoto vyplývajícím závěrem je, že většina žen by měla mít poměr buněk s inaktivovaným X_m a X_p 50:50. Tento model by tak podporovaly i výsledky práce Amos-Landgrafa a kolektivu, kteří stanovili rozložení poměru inaktivace chromozomů X ve skupině více než tisíce žen s běžným fenotypem. Rozložení poměru inaktivace v této studii opravdu odpovídalo náhodné distribuci s průměrem 49:51 a mediánem 50:50 (obrázek 3). Méně než 10 % žen vykazovalo zešíkmenou inaktivaci (tedy stav, kdy množství buněk s inaktivovaným chromozomem maternálního nebo paternálního původu významně převyšuje množství buněk s inaktivovaným druhým chromozomem) v poměru vyšším než 80:20 a jen 0,8 % mělo inaktivaci výrazně zešíkmenou v poměru překračujícím hodnoty 95:5 (Amos-Landgraf et al., 2006).



Obr. 3: Distribuce poměru inaktivace X_m a X_p ve skupině 1005 žen

(Upraveno podle: Amos-Landgraf et al., 2006)

Příčinou výskytu zešíkmení X inaktivace však nemusí být jen prostá náhoda. Nerovnoměrný poměr inaktivace X_m a X_p může být též způsoben přítomností faktoru, typicky genetického původu, který primárně zapříčiní předností inaktivaci jednoho z chromozomů ve fázi iniciace X inaktivace nebo sekundárně, X-vázaným polymorfismem, který poskytne proliferační výhodu či nevýhodu buňkám, v nichž je daný chromozom X aktivní. Příkladem primární příčiny zešíkmení mohou být mutace v genech *Xist* a *Tsix*, které ovlivňují jejich transkripci, jak bylo popsáno u myši (Luikenhuis et al., 2001; Gribnau et al., 2005). Podobně též u člověka byl popsán případ mutace v promotoru *XIST*, která by mohla být odpovědná za preferenční inaktivaci mutovaného chromozomu (Plenge et al., 1997).

Sekundární zešíkmení X inaktivace, které vzniká až po vlastním ustanovení inaktivního chromozomu v buňkách, bylo pozorováno kupříkladu v případě balancovaných translokací části X na autozom. Většina žen s těmito přestavbami vykazovala zešíkmení ve prospěch inaktivace nemutovaného chromozomu tedy tak, aby byla i po inaktivaci zachována genová dávka (Schmidt et Du Sart, 1992). Podobný fenomén se zřejmě může vyskytovat i u některých X-vázaných onemocnění, jako bylo například popsáno u žen s X-vázanými mutacemi způsobujícími mentální poruchy. V publikaci autorů Plenge a kolegové měla přibližně polovina žen X inaktivaci zešíkmenou, což by nasvědčovalo selektivní výhodě buněk s aktivním nemutovaným chromozomem (Plenge et al., 2002). Dalším příkladem sekundárně způsobeného zešíkmení inaktivace chromozomu X je onemocnění způsobené mutací v genu *AIFM1*, který ovlivňuje proces apoptózy (Ghezzi et al., 2010).

1.2.2 Zešíkmení X inaktivace v různých tkáních

Poměr inaktivace chromozomů X je u žen v naprosté většině případů vyšetřován z nukleové kyseliny izolované ze snadno dostupných tkání. Nejčastěji tedy z krve, popřípadě z bukalního stěru. Zejména při zkoumání asociace zešíkmení X inaktivace a projevů X-vázaných chorob u žen je však nutné si položit otázku, zdali se hodnoty zjištěné v jednom typu tkáně nemohou lišit od hodnot v tkáni jiné. Podle současných poznatků u většiny (ne však zcela všech) žen míra zešíkmení X inaktivace ve snadno dostupných tkáních koreluje s mírou zešíkmení v tkáních, které nejsou pro analýzu běžně používány, jako je například tkáň mozková či játra a významné

rozdíly nebyly pozorovány ani při porovnání tkání podle jejich původu ze zárodečných vrstev (Bittel et al., 2008). Zajímavé poznatky přinesla recentní publikace de Hoona a kolektivu, podle jejichž výsledků nejlepší korelaci s ostatními tkáněmi z testovaných snadno dostupných tkání vykazoval bukalní stěr, a je tedy pro hodnocení zešíkmení X inaktivace vhodnější než častěji využívaná krev. Jako ne příliš vhodné se z důvodu špatné korelace s většinou typů tkání ukázaly být vlasové folikuly (de Hoon et al., 2015).

1.2.3 Zešíkmení X inaktivace a věk

Pozoruhodným trendem popisovaným řadou autorů jsou větší rozdíly v míře zešíkmení mezi tkáněmi u starších žen oproti ženám mladším, a to zejména při porovnání hodnot zjištěných v krvi s ostatními tkáněmi. Vysvětlením tohoto jevu by mohla být pomalu působící selekce somatických buněk, jejíž vliv by v krvi byl umocněn vysokou mitotickou aktivitou a krátkou životností krevních buněk (Sharp et al., 2000; Bittel et al., 2008). Mění se tedy poměr inaktivace X_m a X_p ve tkáních s věkem? Výrazné zešíkmení v poměru vyšším než 90:10 bylo v případě práce provedené na skupině 270 žen popsáno u 7 % žen mladších 25 let, ale u žen starších 60 let se tento podíl zvedl až na 16 % (Sharp et al., 2000). V jiné průřezové studii byla popsána slabá avšak signifikantní korelace mezi mírou zešíkmení a věkem žen, autoři zároveň poukazují na fakt, že trend zvyšování přítomnosti zešíkmení X inaktivace se výrazně zesiluje po 30. roce věku (Hatakeyama et al., 2004). V doposud jediné publikované longitudinální studii, ve které byly porovnávány poměry inaktivace chromozomů X u žen s odstupem 13 až 21 let, nebyly pozorovány žádné významné rozdíly v hodnotách zešíkmení u žen, které byly v době prvního odběru mladší 60 let. Výrazný trend se nicméně objevil u žen starších. Výsledky této publikace tak zcela nepodporují předpoklad, že za nárůst zešíkmení X inaktivace s věkem je zodpovědná selekce na buněčné úrovni, která by měla působit víceméně rovnoměrně během celého života, možnými příčinami tohoto fenoménu tak může být spíše krátkodobě působící proces spojený se stářím (Sandovici et al., 2004), či případné změny v metylaci DNA, která je využívána ke stanovení zešíkmení X inaktivace (Hatakeyama et al., 2004). V každém případě je vhodné, zejména při práci se soubory s velkým věkovým rozpětím, brát možné ovlivnění míry zešíkmení X inaktivace v souvislosti s věkem v úvahu.

1.2.4 Zešíkmení X inaktivace a onemocnění

Obecně vládoucím představou o X-vázaných chorobách je, že postihují téměř výhradně muže, neboť ti jsou hemizygoty s pouze jedním chromozomem X, zatímco ženy, které pokud nesou X-vázanou mutaci, pak typicky v heterozygotní sestavě, jsou obvykle považovány jen za přenašečky a onemocnění se u nich běžně neprojevuje. Je však nutné si uvědomit, že naši představu o fungování autozomálně recesivních chorob, ze které tato obecná představa vychází, nelze jednoduše aplikovat na onemocnění způsobená mutací na chromozomu X, neboť řada X-vázaných chorob se s variabilní penetrancí a expresivitou projevuje i u heterozygotek. Jako příčina projevů těchto onemocnění u žen se jasně nabízí právě zešíkmení X inaktivace (Dobyns et al., 2004). Testování poměru inaktivace X_m a X_p u žen nesoucích X-vázanou mutaci tak může sloužit nejen k hlubšímu porozumění molekulární podstatě chorob, ale v případě onemocnění, u kterých by byl jednoznačný vztah mezi zešíkmením X inaktivace a mírou projevů u žen nalezen, by bylo i vhodným nástrojem pro predikci závažnosti projevů.

Mezi onemocnění, u nichž je vliv zešíkmení X inaktivace na fenotyp žen často studován patří řada závažných chorob jako například Duchennova muskulární dystrofie, syndrom fragilního X, či hemofilie A. Pro všechny tyto nemoci existují práce, ve kterých byla korelace mezi mírou zešíkmení a závažností projevů potvrzena (Yoshioka et al., 1998; Berry-Kravis et al., 2005; Bicocchi et al., 2005). Nicméně v případě muskulární dystrofie a syndromu fragilního X byly publikovány též studie, kde jasná korelace mezi zešíkmením a fenotypem chyběla (Ørstavik et al., 2000; Soltanzadeh et al., 2010).

Zešíkmení inaktivace chromozomu X by mohlo být též významným činitelem při rozvoji některých druhů rakoviny u žen. Signifikantně vyšší frekvence výskytu zešíkmení v krevních buňkách byla zaznamenána u žen pod 55 let s familiární rakovinou prsu nesouvisející s mutacemi v genech *BRCA1* a *BRCA2* (Kristiansen et al., 2005). Podobně též v případě žen s invazivní rakovinou vaječníku byl oproti skupině zdravých žen pozorován výrazně častější výskyt nenáhodného rozložení X inaktivace (Buller et al., 1999). Možnou příčinou, která by vysvětlovala podstatu této asociace, by mohl být X-vázaný tumor supresorový gen, který, pokud by byl mutován a přítomný na převážně aktivním chromozomu X, by mohl vést k brzkému nástupu rakoviny (Kristiansen et al., 2005).

Ženy, u nichž byl poměr inaktivace chromozomů X stanovován v naší práci, pocházejí ve většině případů z rodin postižených dědičnou poruchou metabolismu. Dosavadní poznatky o vlivu zešíkmení X inaktivace na projevy nemoci se u jednotlivých chorob různí. Mukopolysacharidóza II. typu (MPS II) je onemocnění, u něž výrazně převládá názor, že právě zešíkmení X inaktivace je nutnou podmínkou pro manifestaci choroby u žen (Guillén-Navarro et al., 2013; Řeboun et al., 2016 v tisku). Podobně v případě deficitu ornitin transkarbamylyázy (OTCD) bylo popsáno několik postižených žen se zešíkmenou X inaktivací, nicméně zde má pravděpodobně nezanedbatelný vliv i typ mutace v genu (Yorifuji et al., 1998; Storkanova et al., 2013). Brutonova agamaglobulinemie (X-vázaná hypogamaglobulinemie, XLA) je považována za onemocnění, u kterého mají buňky s inaktivovaným mutovaným chromozomem selekční výhodu, a tudíž heterozygotní ženy jsou typicky zdravé a se zešíkmenou X inaktivací ve prospěch aktivní nemutované alely (Moschese et al., 2000). Nicméně popsán byl i případ postižené dívky s převážně inaktivovaným nemutovaným chromozomem (Takada et al., 2004). Velmi rozporuplné poznatky a názory o vlivu zešíkmení na fenotyp nalezneme u X-vázané adrenoleukodystrofie (XALD) a Fabryho choroby (Maier et al., 2002; Elstein et al., 2012; Engelen et al., 2014; Echevarria et al., 2015). Práce studující vztah zešíkmení X inaktivace s projevy onemocnění u Danonovy choroby a deficitu 2-methyl-3hydroxybutyryl-koenzym A dehydrogenázy (MHBD) nejsou v současné době dostupné. V případě Danonovy choroby byla nicméně popsána pacientka s příznaky onemocnění, u níž výsledky vyšetření poukazovaly na možnou souvislost mezi fenotypovými projevy a nepříznivým zešíkmení X inaktivace (Majer et al., 2012).

Do naší studie byly též zařazeny ženy z rodiny postižené výskytem X-vázané mitochondriální encefalomyopatie způsobené mutací v genu pro apoptózu indukující faktor 1, *AIFM1*. U doposud popsaných žen nesoucích mutaci v tomto genu bylo popsáno extrémní zešíkmení X inaktivace v krevních buňkách spojené se selekční nevýhodou buněk, které mají aktivní mutovaný chromozom (Ghezzi et al., 2010).

1.3 Metody stanovení zešíkmení X inaktivace

1.3.1 Methylačně senzitivní restrikce DNA

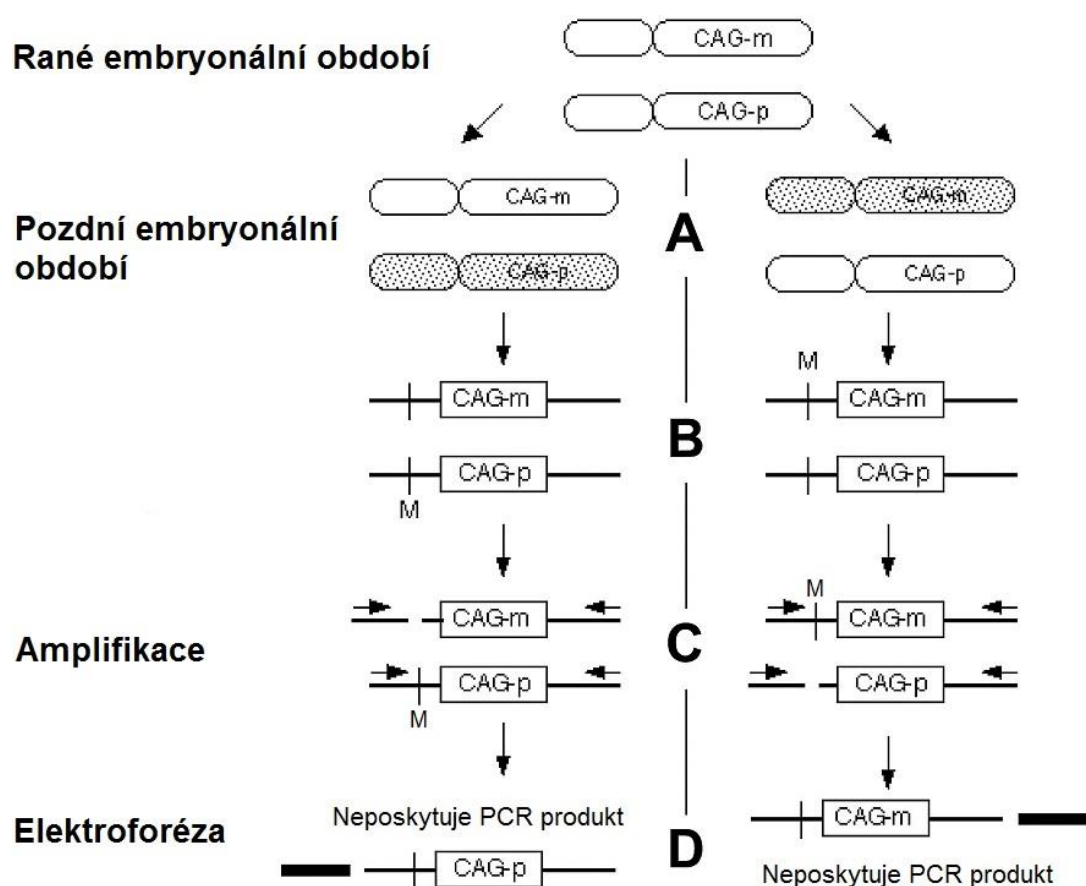
V současné době jsou pro stanovení zešíkmení X inaktivace tradičně využívány metody založené na methylačně senzitivní restrikci genomové DNA a následné amplifikaci polymorfních krátkých tandemových repetice (STR). Tyto metody vychází z původních experimentálních postupů využívajících methylačně senzitivních restrikčních enzymů, které nejsou schopné štěpit, pokud jejich rozpoznávací sekvence obsahuje methylovaný cytosin typický pro heterochromatin inaktivního X. Mezi tyto eseje patří analýza genů *HPRT* a *PGK* využívající polymorfismů délky restrikčních fragmentů, či metody založené na variabilním počtu tandemových repetice v lokusech *DXS255* a *MAOA* (Vogelstein et al., 1987; Boyd et Fraser, 1990; Hendriks et al., 1992).

V současnosti jednoznačně nejčastěji využívanou metodou je analýza (CAG)_n repetice v genu pro lidský androgenní receptor (gen *AR*), metoda HUMARA, popsaná Allenem a kolegy v roce 1992. Hlavními restrikčními enzymy jsou pro tuto metodu HpaII, či HhaI, které štěpí v blízkosti trinukleotidové repetice v prvním exonu genu. Při následné polymerázové řetězové reakci (PCR) je tak celý lokus obsahující jak cílové místo restrikce, tak (CAG)_n repetici, amplifikován jen z methylovaného, tedy inaktivního, chromozomu X (obrázek 4). Pomocí elektroforézy je pak možné kvantifikovat množství inaktivované alely v amplifikovaném vzorku v případě, že alely mají rozdílnou délku repetice. Podle původní publikace je pro tento lokus informativní, tedy heterozygotní v délce repetice, přibližně 90 % žen (Allen et al., 1992). Při vyhodnocování výsledků je však nutné též vyloučit ženy, u nichž se délka alely liší o pouhé jedno opakování motivu, a to z důvodu přítomnosti takzvaných „stutter“ vrcholů či proužků, které vznikají sklouzáváním polymerázy po templátu při PCR. Při vyloučení i těchto případů ve skupině více než 1000 žen, byla metoda HUMARA informativní pro 78 % z nich (Amos-Landgraf et al., 2006). Výsledný poměr je tak obvykle udáván jako procento zastoupení inaktivované maternální/paternální alely ve vzorku buněk.

I kvůli potřebě testovat též ženy neinformativní v repetici androgenního receptoru byla popsána a je využívána řada dalších lokusů, které jsou vhodné pro testování založené na stejném principu jako metoda HUMARA. Poměrně často se tak můžeme setkat i s použitím dinukleotidových

repetic v genech *ZNF261*, *ZDHH15*, *SLITRK4* a *PCSK1N* (Beever et al., 2003; Bertelsen et al., 2011). Nevýhodou dinukleotidových opakování je však větší chybovost při jejich amplifikaci a tedy větší výskyt „stutter“ vrcholů, které znesnadňují konečné vyhodnocování a můžou být příčinou nepřesných výsledků.

V této práci jsme proto upřednostnili využití trinukleotidových repetic v promotorech genů *CNKSR2*, *TMEM185A* a *HMGB3*, které byly v autorském článku informativní pro 18 %, 61 % a 55 % žen a tetranukleotidové repetice na počátku genu retinitis pigmentosa 2 (gen *RP2*), jejíž informativnost se podle autorů blíží informativnosti v lokusu *AR* (Machado et al., 2014; Musalkova et al., 2015).



Obr. 4: Schéma stanovení poměru inaktivace X chromozomů pomocí metody HUMARA; CAG-m repetice na mateřském chromozomu, CAG-p repetice na otcovském chromozomu, M – místo methylace, tečkováním znázorněn inaktivovaný chromozom

(Upraveno podle: Chen et Prchal, 2007)

1.3.2 Nedostatky metod založených na restrikci

Jedním z faktorů, které mohou ovlivnit výsledky získané metodami využívajícími methylačně senzitivní enzymy, je možné nedokonalé štěpení vzorků. V případě nerozštěpení rozpoznávacích sekvencí na všech přítomných aktivních chromozomech X jsou pak tyto molekuly amplifikovány a vyhodnoceny jako pocházející z Xi. Pro kontrolu úplnosti štěpení je běžně používána mužská DNA, která by, vzhledem k přítomnosti pouze jednoho X, neměla po PCR reakci poskytovat žádný produkt. Samozřejmě však nelze s určitostí říci, že restrikce probíhá ve všech vzorcích se stejnou účinností. Další možností je využití kvantitativní PCR a sledování štěpení nemethylovaného lokusu, který na Xi uniká inaktivaci (van Dijk et al., 2002). Nutné je však podotknout, že stav štěpení se může lišit i mezi jednotlivými lokusy.

Spolehlivost metod opírajících se o metylaci DNA může též být ovlivněna již výše zmíněnou možností, že u starších žen dochází ke změnám v methylaci, což by mohlo být příčinou častějšího výskytu zešíkmení právě v této kohortě (Hatakeyama et al., 2004). Významné změny methylace související s věkem byly prokázány (Christensen et al., 2009), nicméně zdali se tyto procesy mohou týkat i lokusů na chromozomu X, které jsou využívány pro stanovení poměru inaktivace X_m a X_p , není jasné. Ve prospěch významu změn methylace spojených s věkem na detekci zešíkmení X inaktivace u starších žen by svědčila studie, ve které byla inaktivace v poměru 80:20 a vyšším stanovena u přibližně 30 % žen starších 65 let pomocí metody HUMARA, nicméně u stejných žen zešíkmení nebylo pozorováno při použití jiné, na transkriptu závislé, metody (Swierczek et al., 2008). Nicméně při podobném porovnání provedeném jinými autory byly výsledky získané metodou HUMARA u starších žen ve shodě s hodnotami zjištěnými jinými metodami založenými na transkriptu (Busque et al., 2009).

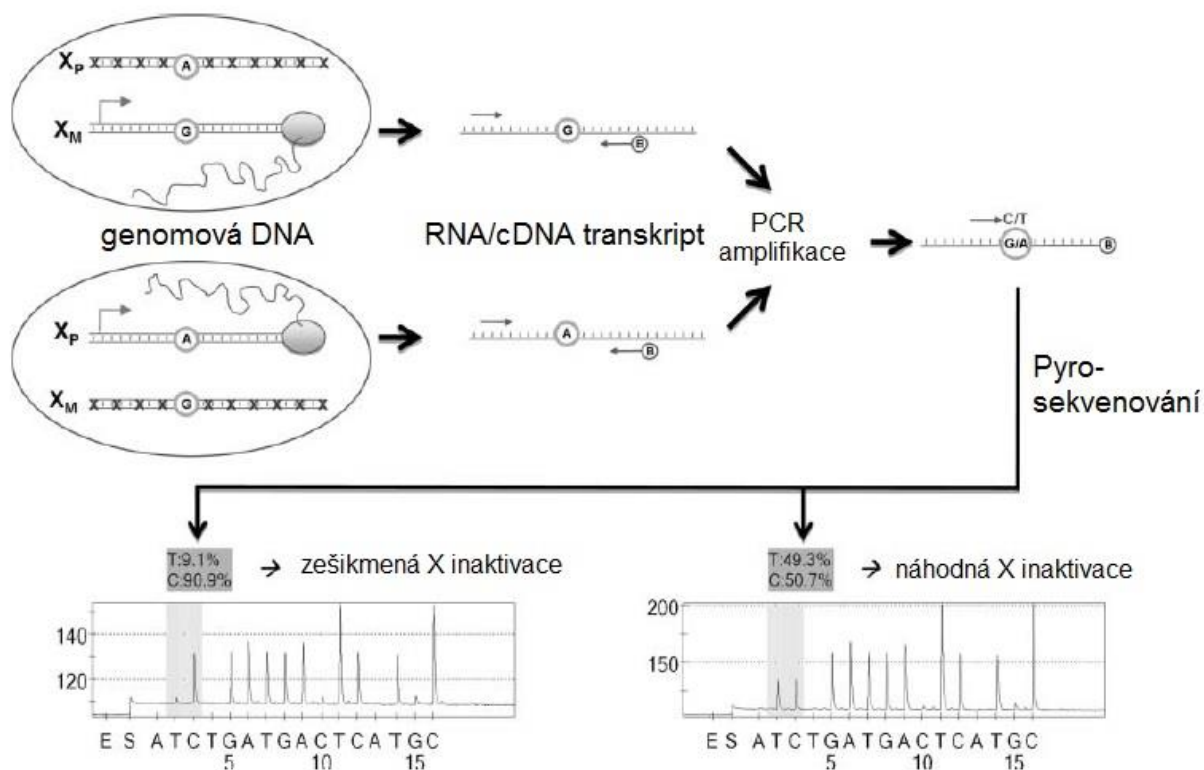
Tato rozdílná pozorování vedla autory Swierczek a kolektiv k dalšímu bádání a porovnání výsledků získaných metodou HUMARA a na transkriptu založenou studií i u skupiny mladších žen (věk 22 – 55). I v tomto případě byly u některých žen zjištěny výrazně odlišné hodnoty. Jako příčinu této diskrepance autoři označují heterogenitu methylace v lokusu *AR*. Jak již bylo zmíněno výše, HUMARA je založena na přítomnosti methylace v prvním exonu, ta však zřejmě nemusí nutně odpovídat methylaci v CpG ostrůvku promotoru genu, která je považována za směrodatnou pro umlčení transkripční aktivity genu (Sharp et al., 2011; Swierczek et al., 2012).

Zejména v případě, že chceme míru zešíkmení X inaktivace korelovat se závažností projevů X-vázaného onemocnění u žen, se jako komplikace jeví složitost asociace statutu inaktivace kupříkladu v lokusu *AR* s lokalizací mutovaného genu na *Xa* či *Xi*. I v případě, že máme k dispozici vzorky od příbuzných ženy a můžeme tak teoreticky podle délky repeticity určit, jestli se mutovaný gen nachází na aktivním či inaktivovaném chromozomu, hrozí nebezpečí, že během gametogeneze došlo mezi markerovým lokusem a genem zodpovědným za onemocnění k rekombinaci. V úvahu je nutné též brát možnost, že právě s onemocněním svázaný gen uniká inaktivaci, a tudíž pro něj statut inaktivace chromozomu, na němž se mutovaná alela nalézá, nemá velkou vypovídací hodnotu.

Poměrně málo diskutovaným faktem je skutečnost, že počet opakování trinukleotidu CAG v prvním exonu genu *AR*, kterého využívá metoda HUMARA, je ve spojení s výskytem některých onemocnění. Vysoký počet opakování motivu je pravděpodobnou příčinou rozvoje Kennedyho choroby (Spada et al., 1991). Naopak se snižujícím se počtem opakování se u mužů zvyšuje riziko rozvoje rakoviny prostaty (Giovannucci et al., 1997).

1.3.3 Kvantifikace transkriptu

Vzhledem k výše zmíněným nejasnostem a nedostatkům metod využívajících methylačně senzitivní restrikci vyvstává potřeba hledat nové přístupy založené na odlišných principech. V posledních letech se stále více uplatňují metody využívající kvantifikaci transkriptu izolovaného z buněk nebo přesněji spíše komplementární DNA (cDNA) kterou získáme reverzní transkripcí z RNA. Pro odlišení transkriptu pocházejícího z maternálního a paternálního chromozomu jsou využívány typicky jednonukleotidové polymorfismy (SNPs). Komplementární DNA lze kvantifikovat několika způsoby, současně nejvyužívanějším přístupem pro stanovení poměru inaktivace chromozomů X je zřejmě pyrosequenování. V tomto případě po reverzní transkripci polymorfního lokusu RNA následuje amplifikace cDNA a poté samotné pyrosequenování, které nám díky přítomnosti SNPs umožňuje vyhodnotit množství cDNA ve vzorku pocházející z jednotlivých chromozomů X. Výsledný poměr je tak typicky udáván jako procentuální poměr zastoupení jednotlivých alel (obrázek 5) (Mossner et al., 2013).



Obr. 5: Schéma stanovení poměru inaktivace X chromozomů kvantifikací transkriptu pomocí pyrosekvenování

(Upraveno podle: Mossner et al., 2013)

Mezi další popsané metodické přístupy, kterými je možné vyhodnotit poměr inaktivace chromozomů X pomocí transkriptu, patří esej, kterou pro své testování používají autoři Swierczek a kolektiv. Tato metoda taktéž využívá cDNA a SNPs, samotná kvantifikace je však stanovována pomocí alelově specifické kvantitativní PCR (Swierczek et al., 2008). Na obdobném principu avšak s využitím TaqMan sond je založena i další publikovaná metoda (Busque et al., 2009).

Podobně jako u metod založených na methylačně senzitivní restrikci i pro přístupy využívající RNA jsou naprosto zásadní vhodně vybrané testované lokusy. Ty by měly být jednak dostatečně polymorfní v rámci populace, pro kterou mají být použity, a zároveň by se zvolené SNPs měly nacházet v genech, které neunikají inaktivaci tak, aby nedošlo ke zkreslení výsledků, a samozřejmě se též musí jednat o polymorfismus v genu transkribovaném v testované tkáni. Mezi polymorfismy, které lze pro stanovení zešíkmení X inaktivace použít, jsou řazeny SNPs

v genech *BTK* (rs1135363), *IDS* (rs1141608), *FHL1* (rs9018), *G6PD* (rs2230037) a *MPP1* (rs1126762), číslo v závorce uvádí identifikační kód SNPs v databázi dbSNP, NCBI, (Mossner et al., 2013).

Značnou výhodou pro studium korelace zešíkmení X inaktivace a projevů onemocnění u heterozygotek je možnost v některých případech hodnotit alelově specifickou expresi přímo genu spojeného s chorobou. Za takových podmínek můžeme získané hodnoty jednoznačně asociovat s mutovanou či zdravou alelou a výsledek též nebude zkreslen v případě, že daný gen inaktivaci uniká. Nicméně při interpretaci výsledků musíme opět přihlížet k tomu, že soubor genů unikajících inaktivaci se může v různých tkáních lišit. Takto testovat také není možné alely s velmi komplexními mutacemi (Engelen et al., 2014).

1.3.4 Využití paralelního sekvenování

Předmětem naší práce je stanovení zešíkmení inaktivace chromozomu X u souboru žen a porovnání výsledků získaných tradičními na methylačně senzitivní restrikci založenými metodami s hodnotami zjištěnými pomocí kvantifikace transkriptu. Komplementární DNA byla kvantifikována a poměr inaktivace chromozomů X tak stanovován metodou hlubokého sekvenování ampliconů, která vychází z paralelního sekvenování. V recentní publikaci autorů Acuna-Hidalgo a kolegové se tato metoda ukázala být vysoce přesnou a reprodukovatelnou pro detekci nízkofrekvenčních somatických mozaicismů a mohla by tak být velkým přínosem a vhodným ekvivalentem i pro studium zešíkmení X inaktivace (Acuna-Hidalgo et al., 2015). Pro stanovení poměru inaktivace chromozomů X byly v naší práci použity tři polymorfismy ve třech různých genech: *LAMP2* c.156A>T (rs12097), *IDS* c.438C>T (rs1141608) a *ABCD1* c.1548G>A (rs41314153). Všechny tyto polymorfismy jsou považovány za benigní a v populaci se vyskytují s poměrně vysokou frekvencí (URL1, 2, 3).

1.3.5 Další metody

Mimo methylačně-senzitivní restrikce a analýzy transkriptu byly popsány i další metody pro stanovení zešíkmení X inaktivace, v současnosti jsou však používány spíše sporadicky.

Methylaci DNA lze detekovat nejen pomocí methylačně senzitivních enzymů, využít je možné též modifikaci DNA disířičitanem sodným, ten způsobuje přeměnu nemethylovaného cytosinu na uracil, přičemž methylovaný cytosin zůstává nezměněn (Frommer et al., 1992). Tyto změny poté lze využít při methylačně senzitivní PCR za použití primerů specifických pro methylovanou, či nemethylovanou DNA. Tento postup tak funguje na stejném principu, jako protokoly využívající methylačně senzitivních restriktáz, v praxi je proto typicky využíván jako modifikace metody HUMARA, jejíž výhodou je větší spolehlivost při komplementaci výsledků získaných za použití primerů pro methylovanou i nemethylovanou DNA (Kubota et al., 1999; Musalkova et al., 2015).

V některých případech je možné pro stanovení poměru inaktivace chromozomů X využít přímo proteinový produkt určitého genu. Tento metodický přístup lze aplikovat kupříkladu u heterozygotních žen s mutací zabraňující expresi genu, u kterých pak lze stanovit poměr protein pozitivních a negativních buněk (Engelen et al., 2014). Další možností je kvantifikace strukturně odlišných variant téhož proteinu, jako je glukóza-6-fosfát-dehydrogenáza, která se vyskytuje ve formě izoenzymu A a B, které lze odlišit pomocí elektroforézy (Migeon, 2014).

2 Hypotézy a cíle

Zešíkmení inaktivace chromozomu X je často studováno v souvislosti s projevy X-vázaných onemocnění u žen. U celé řady onemocnění je však vztah mezi fenotypovými projevy a mírou zešíkmení stále nejasný, přičemž jednou z možných příčin rozdílných pozorování je zvolený metodický přístup. V současnosti nejčastěji používanou metodou pro stanovení poměru inaktivace chromozomů X je analýza methylace v genu pro lidský androgenní receptor, metoda HUMARA. Nicméně ta je neinformativní pro 10 – 20 % žen v populaci a faktory jako nedokonalé štěpení vzorku, crossing-over, či methylace v lokusu neodpovídající (in)aktivnímu statutu chromozomu mohou mít vliv na výsledek nebo jeho interpretaci. Hledány jsou proto nové lokusy vhodné pro methylačně senzitivní restrikci jako námi použité dříve publikované *CNKSR2*, *TMEM185A*, *HMGB3* a *RP2* i zcela jiné metodické přístupy jako metoda analyzující transkript pomocí paralelního sekvenování.

Předpokládáme, že kombinací několika metod se nám podaří stanovit velmi přesné hodnoty poměru inaktivace chromozomů X a metoda kvantifikující transkript pomocí paralelního sekvenování v tomto kontextu poskytne možnost robustní a efektivní analýzy zešíkmení X inaktivace.

Na základě těchto očekávání jsme si definovali následující cíle diplomové práce:

- Stanovit poměr inaktivace chromozomů X u skupiny žen na základě methylace v lokusech *AR*, *CNKSR2*, *TMEM185A*, *HMGB3*, *RP2* a pomocí kvantifikace transkriptu s využitím polymorfismů *LAMP2* c.156A>T, *IDS* c.438C>T a *ABCD1* c.1548G>A.
- Zhodnotit nedostatky a robustnost jednotlivých metod a porovnat hodnoty jimi stanovené.
- Zhodnotit rozložení poměrů inaktivace chromozomů X v rámci celé námi studované skupiny žen heterozygotních pro X-vázané onemocnění a jejich příbuzných.

3 Materiál a metody

3.1 Soubor osob

Data použitá v této práci byla získána od pacientek a pacientů Ústavu dědičných metabolických chorob 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a jejich příbuzných, kteří poskytli informovaný souhlas. Výchozím materiálem byla periferní krev odebraná do EDTA zkumavek a v některých případech bukalní stěr. Pro kontrolní mužské vzorky byla použita periferní krev od dobrovolných dárců.

Do naší studie bylo zařazeno 54 žen evropského původu z celkem 33 rodin. Nejmladší pacientce byl 1 rok, nejstarší ženě 64 let, medián byl 26 let. Jednalo se o ženy nesoucí X-vázanou mutaci způsobující onemocnění s různou mírou fenotypových projevů a jejich příbuzné. Konkrétní typ onemocnění a počty žen jsou vypsány v tabulce 1.

Tab. 1: Typy onemocnění a počty žen, jejichž vzorky byly použity

onemocnění v rodině	počet žen ve studii
OTCD	27
XALD	7
XLA	5
Danonova choroba	5
<i>AIFM1</i> encefalomyopatie	4
Fabryho choroba	3
MPS II	2
MHBD deficiencie	1

Z krve a bukalních stěrů jsme izolovali DNA, kterou jsme využili pro metody založené na methylačně senzitivní restrikci. U 32 žen bylo možné izolovat z krve celkovou RNA, jež jsme použili pro metodu paralelního sekvenování.

3.2 Izolace DNA

3.2.1 Izolace DNA z krve

Optimalizace protokolu jsou rozebrány v kapitole 4.1.1.

Původní protokol

Chemikálie

sada Nucleo Spin Dx Blood, MACHEREY-NAGEL, Německo

- pufr B3
- pufr BE
- vymývací pufr B5
- vymývací pufr BW
- Proteinkináza K

96-100% ethanol, Penta, Praha

PBS (pH = 7,4) – 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 2,17 g Na₂HPO₄ x 7 H₂O, Riegel-de Haën, Německo, doplněno 1 000 ml vody

Postup

1. Izolaci DNA jsme prováděli v DNA/RNA dekontaminačním boxu.
2. Do lyzační zkumavky jsme napipetovali 25 µl Proteinkinázy K a přidali 200 µl krve z odběrové nádoby. V případě, že krve bylo méně, jsme potřebný objem doplnili fosfátovým pufrem.
3. Ke směsi jsme přidali 200 µl pufru B3 a promíchali na vortexu po dobu 10 – 20 s.
4. Vzorky jsme nejprve inkubovali 5 minut při pokojové teplotě a následně vložili do termobloku nastaveného na teplotu 70 °C na 10 – 15 minut. Po inkubaci jsme vzorky řádně promíchali na vortexu a krátce centrifugovali.
5. Poté jsme do zkumavky přidali 210 µl ethanolu, opět promíchali a krátce centrifugovali.
6. Vzorek jsme přenesli na kolonku v nové zkumavce a centrifugovali 12 800 rpm po 1 minutu. Zkumavku s eluátem jsme vyhodili a kolonku přenesli do nové zkumavky.
7. Na kolonku jsme pipetovali 500 µl pufru BW, centrifugovali 12 800 rpm po 1 minutu. Zkumavku s eluátem jsme opět vyhodili a kolonku přenesli do nové zkumavky.
8. Na kolonku jsme pipetovali 600 µl pufru B5, centrifugovali 12 800 rpm po 1 minutu a zkumavku s eluátem vyhodili a kolonku přenesli do nové zkumavky.

9. Kolonku jsme centrifugovali na sucho za stejných podmínek jako v přecházejícím kroku.
10. Kolonku jsme přenesli do eluční zkumavky a na střed kolonky pipetovali 100 μ l pufru BE a centrifugovali 12 800 rpm po 1 minutu.
11. Eluát s DNA jsme přenesli do nové označené zkumavky a skladovali v lednici při +2 až +12 °C.

Současný protokol

Chemikálie

sada QIAamp DNA Blood Mini Kit, QIAGEN, Německo

- AE pufr
- AL pufr
- AW1 pufr
- AW2 pufr
- QIAGEN Proteáza

96-100% ethanol, Penta, Praha

PBS (pH = 7,4) – 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 2,17 g Na₂HPO₄ x 7 H₂O, Riegel-de Haën, Německo, doplněno 1 000 ml vody

Postup

1. Izolaci DNA jsme prováděli v DNA/RNA dekontaminačním boxu
2. Při izolaci z čerstvé krve jsme si do jedné zkumavky napipetovali 20 μ l QIAGEN proteázy, v případě izolace ze zamražené krve jsme jeden vzorek krve izolovali do dvou zkumavek.
3. Do zkumavky jsme přidali 200 μ l krve z odběrové nádoby. V případě, že krve bylo méně, jsme potřebný objem doplnili fosfátovým pufrem.
4. Ke každému vzorku jsme přidali 200 μ l AL pufru a promíchali na vortexu po dobu 15 s.
5. Vzorky jsme inkubovali 10 minut při 56 °C v termobloku a následně krátce centrifugovali.

6. Do zkumavky jsme přidali 200 μ l ethanolu, promíchali na vortexu po dobu 15 s a krátce centrifugovali.
7. Vzorek jsme přenesli na kolonku v nové zkumavce a centrifugovali při 8 000 rpm po 1 minutu. Eluát jsme vylili do nádoby na tekutý odpad.
8. Na kolonku jsme pipetovali 500 μ l AW1 pufru a centrifugovali při 8 000 rpm po 1 minutu. Eluát jsme vylili do nádoby na tekutý odpad.
9. Na kolonku jsme pipetovali 500 μ l AW2 pufru a centrifugovali při 14 000 rpm po 3 minuty. Eluát jsme vylili do nádoby na tekutý odpad.
10. Kolonku jsme centrifugovali na sucho při 14 000 rpm po 1 minutu.
11. Kolonku jsme přenesli do čisté zkumavky a na kolonku pipetovali 25 μ l AE pufru, inkubovali při laboratorní teplotě 3 minuty a centrifugovali při 8 000 rpm po 1 minutu. Při izolaci z čerstvé krve jsme tento krok opakovali ještě jednou.
12. Eluát s DNA jsme přenesli do označené zkumavky a uchovávali v lednici při +2 až +12 °C

3.2.2 Izolace DNA z buklálníhoho stěru

Chemikálie

sada QIAamp DNA Micro Kit, QIAGEN, Německo

- AE pufr
- AL pufr
- ATL pufr
- AW1 pufr
- Proteinkináza K

1M dithiotreitol (DTT), Sigma-Aldrich, USA

96-100% ethanol, Penta, Praha

voda z Direct-Q systému, Millipore

Postup

1. Izolaci DNA jsme prováděli v DNA/RNA dekontaminačním boxu.

2. Do zkumavky s kartáčkem, kterým byl setřen epitel, jsme přidali 600 μ l ATL pufru, 20 μ l proteinkinázy K, 20 μ l DTT a promíchali na vortexu.
3. V termobloku předehřátém na 56 °C jsme zkumavku inkubovali po 1 hodinu, přičemž jsme každých 10 minut zkumavku promíchali na vortexu.
4. Poté jsme přidali 600 μ l AL pufru a promíchali na vortexu.
5. Vzorek jsme inkubovali 10 minut při 70 °C v termobloku a každé 3 minuty promíchali.
6. Do zkumavky jsme přidali 300 μ l ethanolu, promíchali na vortexu po dobu 15 s a krátce centrifugovali.
7. Následně jsme ze zkumavky vyjmuli kartáček.
8. Roztok jsme přenesli na kolonku v nové zkumavce v maximálním objemu 700 μ l.
9. Zkumavku jsme centrifugovali při 8 000 rpm po 1 minutu a eluát vylili do nádoby na tekutý odpad.
10. Na kolonku jsme pipetovali 500 μ l AW1 pufru, centrifugovali při 8 000 rpm po 1 minutu a eluát vylili do nádoby na tekutý odpad.
11. Poté jsme na kolonku pipetovali 500 μ l AW2 pufru a centrifugovali při stejných podmínkách jako v kroku 10. Eluát jsme opět vylili do nádoby na tekutý odpad.
12. Kolonku jsme ještě centrifugovali na sucho při 14 000 rpm po 3 minuty.
13. Kolonku jsme přenesli do nové zkumavky a pipetovali na ni 2x 15 μ l vody zahřáté na 50 °C.
14. Zkumavku jsme inkubovali 1 až 5 minut při laboratorní teplotě a centrifugovali při 14 000 rpm po 1 minutu.
15. Eluát s DNA jsme přenesli do označené zkumavky a uskladnili v lednici při +2 až +12 °C.

3.3 Methylačně senzitivní analýza

3.3.1 Methylačně senzitivní restrikce

Vzorek od každé pacientky byl vždy zpracován ve dvou variantách, jednou jsme k naředěné DNA přidali mix chemikálií obsahující methylačně senzitivní restriktázu, ve druhém případě jsme tento enzym v mixu nahradili vodou. Tímto způsobem pak bylo možné při vyhodnocování

výsledků zohlednit přednostní amplifikaci jedné z alel. Pro kontrolu úplnosti štěpení byl ke každé sérii vzorků přiřazen i vzorek mužské DNA jako kontrola.

Optimalizace protokolu jsou též rozebrány v kapitole 4.1.1.

Původní protokol pro lokusy v genech *AR*, *CNKS2*, *TMEM185A* a *HMGB3*

Chemikálie

restrikční enzymy a pufr; New England BioLabs, USA

- NEBuffer1.1 pufr 10x
- HpaII (10U)
- HpyCH4III (5U)
- RsaI (10U)

voda z Direct-Q systému, Millipore

Postup

1. Koncentraci DNA v izolovaném vzorku jsme změřili pomocí spektrofotometru (BioSpec-nano, Shimadzu Biotech).
2. Podle naměřené koncentrace jsme z izolátu odebrali do zkumavky objem odpovídající 200 ng DNA a doplnili vodou tak, aby celkový objem reakce byl vždy 8,5 µl pro lokusy *AR* a *CNKS2* a 8,25 µl pro lokusy *TMEM185A* a *HMGB3*.
3. Obsah zkumavek jsme promíchali na vortexu a krátce stočili.
4. Naředěné vzorky jsme uložili do chladicího stojánku a podle tabulky 2 a 3 jsme si do prázdných zkumavek připravili celkový mix pro všechny vzorky v jedné verzi obsahující methylačně senzitivní restriktázu Hpa II – „štěpící mix“ a ve druhé verzi bez tohoto enzymu – „neštěpící mix“. Jako pomocný enzym, který štěpí mimo oblast analýzy a činní tak rozpoznávací místa přístupnější pro HpaII, jsme pro lokusy *AR* a *CNKS2* použili restriktázu RsaI, pro *TMEM185A* a *HMGB3* restriktázu HpyCH4III.

Tab. 2: Složení restrikční směsi pro lokusy *AR* a *CNKS2*

	štěpící mix	neštěpící mix
	1 reakce (μl)	1 reakce (μl)
NEB pufr	1,00	1,00
HpaII	0,25	0,00
RsaI	0,25	0,25
H2O	0,00	0,25

Tab. 3: Složení restrikční směsi pro lokusy *TMEM185A* a *HMGB3*

	štěpící mix	neštěpící mix
	1 reakce (μl)	1 reakce (μl)
NEB pufr	1,00	1,00
HpaII	0,25	0,00
HpyCH4III	0,50	0,50
H2O	0,00	0,25

5. Tyto směsi jsme pak po promíchání na vortexu a stočení rozpipetovali do zkumavek se vzorky v chladicím stojánku po 1,5 μl, respektive 1,75 μl pro markery *TMEM185A* a *HMGB3*.
6. Takto připravené vzorky jsme promíchali na vortexu, stočili, vložili do termocyklu (DNA Engine Dyad, BioRad) a inkubovali při 37°C přes noc a následně enzymy inaktivovali při 95° po dobu 10 minut.

Současný protokol pro lokusy v genech *AR*, *CNKS2* a blízkosti genu *RP2*

Chemikálie

restrikční enzymy a pufr; New England BioLabs, USA

- CutSmart pufr 10x
- HpaII (10U)
- RsaI (10U)

voda z Direct-Q systému, Millipore

Postup

1. Koncentraci DNA v izolovaném vzorku jsme změřili pomocí spektrofotometru (BioSpec-nano, Shimadzu Biotech).
2. Podle naměřené koncentrace jsme z izolátu odebrali do zkumavky objem odpovídající 100 ng DNA a doplnili vodou tak, aby celkový objem reakce byl vždy 21,8 µl, respektive 22 µl pro lokus *RP2*.
3. Obsah zkumavek jsme promíchali na vortexu a krátce stočili.
4. Naředěné vzorky jsme uložili do chladicího stojánku a podle tabulky 4 a 5 jsme si do prázdných zkumavek připravili celkový mix pro všechny vzorky v jedné verzi obsahující methylačně senzitivní restriktázu Hpa II – „štěpící mix“ a ve druhé verzi bez tohoto enzymu – „neštěpící mix“. Jako pomocný enzym jsme pro lokus *AR* a *CNKSR2* použili restriktázu RsaI, lokus *RP2* byl inkubován bez pomocného enzymu.

Tab. 4: Složení štěpící směsi pro lokusy *AR* a *CNKSR2*

	štěpící mix	neštěpící mix
	1 reakce (µl)	1 reakce (µl)
CS pufr	2,5	2,5
HpaII	0,5	0,0
RsaI	0,2	0,2
H ₂ O	0,0	0,5

Tab. 5: Složení štěpící směsi pro lokus *RP2*

	štěpící mix	neštěpící mix
	1 reakce (µl)	1 reakce (µl)
CS pufr	2,5	2,5
HpaII	0,5	0,0
H ₂ O	0,0	0,5

5. Tyto směsi jsme pak po promíchání na vortexu a stočení rozpipetovali do vzorků v chladícím stojánku po 3,2 µl pro lokusy *AR* a *CNKSR2* a 3 µl pro lokus *RP2*.
6. Takto připravené vzorky jsme promíchali a vložili do termocykleru (DNA Engine Dyad, BioRad) a inkubovali při 37°C přes noc a následně enzymy inaktivovali při 80°C po dobu 20 minut.

3.3.2 PCR a fragmentační analýza

Chemikálie

PCR

Plain PP Master Mix a PCR Ultra H₂O, Top-Bio, Praha

Deep Vent, New England BioLabs, USA

KlenTaq1, GeneAge Technologies, Praha

Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma-Aldrich, USA

dNTPs, LAROVA, Německo

PC2 pufr – 50 mM Tris HCl; 16 mM (NH₄)₂SO₄; 2,5 mM MgCl₂, Sigma-Aldrich, USA;

150 µg/ml BSA, New England BioLabs, USA

primery

AR přímý (for)	Cy5-GCTGTGAAGGTTGCTGTTCCCTCAT
AR zpětný (rev)	TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC
CNKSR2 for	6-FAM-CGAGCGGGCAAGTTGGCTGA
CNKSR2 rev	TGTCGGGTCTCGCGGCTGTA
RP2 for	PET-TGACATAGCGAGACCCTGTG
RP2 rev	GTGGTGGGTTCTCTAGCTGG

Gelová elektroforéza

PCR agaróza, Top-Bio,s.r.o, Praha

10x TBE pufr – 54 g Tris base, 27,5 g kyselina boritá, 3,725 g EDTA, Sigma-Aldrich, USA, doplněno do 500 ml vodou

DNA Gel Loading Dye 6x, Applied Biosystems, USA

Gene Ruler 100bp DNA Ladder Plus, Applied Biosystems, USA

GelRed 20 000x, Biotium, USA

voda z Direct-Q systému, Millipore

Kapilární elektroforéza

Hi-Di formamid Applied Biosystems, USA

GeneScan 500 ROX, Applied Biosystems, USA

Postup

Původní PCR protokol pro lokusy *AR*, *CNKS2*, *TMEM185A* a *HMGB3*

1. V laminárním boxu jsme pro všechny vzorky připravili celkovou směs chemikálií podle tabulky 6 či 9. Hotový mix jsme promíchali na vortexu, stočili a následně rozpipetovali do zkumavek v chladicím stojánku po 6 μ l.

Tab. 6: Složení PCR směsi pro lokusy *CNKS2*, *TMEM185A* a *HMGB3*, objem pro jednu reakci

PC2 (10x)	1,00 μ l
dNTPs, 2 mmol/l	1,00 μ l
Primery for 10 pmol/ μ l	0,30 μ l
Primery rev 10 pmol/ μ l	0,30 μ l
Klen-Taq	0,03 μ l
DeepVent 1/20	0,02 μ l
DMSO	1,00 μ l
Voda	2,35 μ l

2. Do každé zkumavky jsme poté přidali 4 μ l DNA inkubované přes noc s restrikčními enzymy a promíchali.
3. Ke každé sérii vzorků jsme připravovali vzorek ke kontrole čistoty PCR směsi, do kterého byly místo 4 μ l DNA přidány 4 μ l vody.
4. Takto připravené vzorky jsme vložili do termocykleru (DNA Engine Dyad, BioRad) k amplifikaci DNA při podmínkách podle tabulky 7 či 8.

Tab. 7: Původní podmínky PCR pro lokus *AR*

teplota (°C)	čas (s)	
94	120	
94	15	
63	20	30x
72	50	
72	600	

Tab. 8: Původní podmínky PCR pro lokusy *CNKSR2*, *TMEM185A* a *HMGB3*

teplota (°C)	čas (s)	
95	120	
95	5	
68	20	25x
68	600	

Současný PCR protokol pro lokusy *AR*, *CNKSR2* a *RP2*

1. V laminárním boxu jsme pro všechny vzorky připravili celkovou směs chemikálií podle tabulky 9, 10 či 11. Hotový mix jsme promíchali na vortexu, stočili a následně rozpipetovali do zkumavek v chladicím stojánku po 6 µl pro lokus *AR*, 6,1 µl pro lokus *CNKSR2* a 8 µl pro lokus *RP2*.

Tab. 9: Složení PCR směsi pro lokus *AR* pro jednu reakci

PlainPP Master Mix	5,0 µl
Primer <i>AR</i> for 10 pmol/µl	0,3 µl
Primer <i>AR</i> rev 10 pmol/µl	0,3 µl
Voda	0,4 µl

Tab. 10: Složení PCR směsi pro lokus *CNKSR2* pro jednu reakci

PlainPP Master Mix	5,0 µl
Primer <i>CNKSR2</i> for 10 pmol/µl	0,3 µl
Primer <i>CNKSR2</i> rev 10 pmol/µl	0,3 µl
DMSO	0,5 µl

Tab. 11: Složení PCR směsi pro lokus *RP2* pro jednu reakci

PC2 (10x)	1,000 µl
dNTPs, 2 mmol/l	1,000 µl
Primery <i>RP2</i> for 10 pmol/µl	0,150 µl
Primery <i>RP2</i> rev 10 pmol/ µl	0,150 µl
Klen-Taq	0,048 µl
DeepVent 1/20	0,022 µl
Voda	5,678 µl

2. Každou zkumavku jsme poté doplnili do celkového objemu 10 µl o DNA inkubovanou přes noc a promíchali na vortexu a stočili.
3. Ke každé sérii vzorků jsme připravovali vzorek ke kontrole čistoty PCR směsi, do kterého byla místo DNA přidána voda.
4. Takto připravené vzorky jsme vložili do termocykleru (DNA Engine Dyad, BioRad) k amplifikaci DNA při podmínkách podle tabulky 12 či 13.

Tab. 12: Podmínky PCR pro lokusy *AR* a *CNKSR2*

teplota (°C)	čas (s)	30x
94	120	
94	15	
63	20	
72	30	
72	600	

Tab. 13: Podmínky PCR pro lokus *RP2*

teplota (°C)	čas (s)	28x
94	300	
94	30	
64	30	
68	30	
68	1800	

Gelová elektroforéza

Úspěšnost amplifikace DNA a rozštěpení mužské kontroly jsme předběžně hodnotili pomocí vizualizace produktů PCR na gelové elektroforéze.

1. Z agarózy a 1x TBE pufru jsme si připravili 1% agarózový gel, do kterého jsme přidali 1 μ l barviva GelRed 20 000x.
2. Z každého vzorku po PCR jsme odebrali po 4 μ l a na destičce smíchali s 2 μ l barviva DNA Gel Loading Dye 6x a poté pipetovali na gel.
3. Ke každé řadě vzorků byl na gel pipetován standard pro kontrolu délky fragmentů připravený z 2 μ l Gene Ruler 100bp DNA Ladder Plus, 2 μ l DNA Gel Loading Dye 6x a 4 μ l vody.
4. Elektroforéza probíhala při napětí 100 V přibližně 15 minut a vzorky jsme následně vizualizovali pomocí UV lampy.

Kapilární elektroforéza

1. Na mikrotitrační destičku jsme do jamky pro každý vzorek napipetovali 9 μ l Hi-Di formamidu, 0,5 μ l 5x ředěného vnitřního standardu délky GeneScan 500 ROX a 0,5 μ l vzorku po PCR.
2. Takto připravené vzorky pro elektroforézu jsme promíchali a krátce centrifugovali a následně denaturovali při 95°C po dobu 3 minut v termocykleru (DNA Engine Dyad, BioRad).
3. Analýza probíhala na kapilární elektroforéze 3500xL Genetic Analyzer, Applied Biosystems.

3.3.3 Vyhodnocení výsledků

1. Analýzu STR lokusů jsme prováděli v programu GeneMapper 5.
2. K výpočtu poměru inaktivace chromozomů X jsme použili hodnoty výšky vrcholů pro každou z alel a provedli výpočet podle následujících vzorců.

$$A = \frac{V3 \times 0,5 \times (V1 + V2)}{V1}$$

$$B = \frac{V4 \times 0,5 \times (V1 + V2)}{V2}$$

V1..... suma výšek vrcholů pro kratší alelu ve vzorku bez štěpícího enzymu

V2..... suma výšek vrcholů pro delší alelu ve vzorku bez štěpícího enzymu

V3..... suma výšek vrcholů pro kratší alelu ve vzorku se štěpícím enzymem

V4..... suma výšek vrcholů pro delší alelu ve vzorku se štěpícím enzymem

Pomocí těchto vzorců jsme určili korigovanou výšku vrcholu pro kratší (A) a delší (B) alelu. Pro výpočet procentuálního zastoupení kratší (C) a delší (D) alely jsme pak použili vzorce

$$C = \frac{A}{A + B} \times 100$$

a

$$D = \frac{B}{A + B} \times 100$$

3. Výsledky jsme hodnotili jen v případě, že délkový rozdíl mezi alelami byl alespoň 2 opakování motivu pro lokusy *AR* a *CNKSR2* a alespoň 1 opakování motivu pro lokus *RP2*. V ostatních případech jsme nemohli hodnotu zešíkmení spolehlivě určit a označili jsme je proto jako neinformativní.

3.4 Kvantifikace transkriptu pomocí paralelního sekvenování

Vzorky pro paralelní sekvenování na platformě Illumina byly zpracovány Mgr. Martinem Řebounem a pracovníky Endokrinologického ústavu. Transkript byl kvantifikován pomocí polymorfismů *LAMP2* c.156A>T, *IDS* c.438C>T a *ABCD1* c.1548G>A za použití protokolů k příslušným níže vypsáním sadám.

Prvním krokem analýzy bylo stanovení, které ženy z naší skupiny byly v daných lokusech heterozygotní. K tomuto účelu byla využita DNA izolovaná podle protokolů uvedených v kapitole 3.2.1, kterou jsme následně amplifikovali a PCR produkty sekvenovali Sangerovou metodou na analyzátoru 3500xL Genetic Analyzer, Applied Biosystems.

Celková RNA byla izolována z krve pomocí sady BiOstic Blood Total RNA Isolation Kit, MO BIO Laboratories a následně přepisována do cDNA sadou High Capacity RNA-to-cDNA od firmy Applied Biosystems. Komplementární DNA jsme poté amplifikovali v termocykleru DNA Engine Dyad, BioRad. Knihovny byly připraveny pomocí sady Illumina Nextera XT Library Prep Kit od společnosti Illumina a sekvenovány na MiSeq sekvenátoru s použitím sady MiSeq Reagent Kit v2. Získaná data byla zpracována pomocí programů TopHat a Picard Tools a konečný poměr alel vyhodnocen z programu Integrative genomics viewer.

3.5 Statistické zpracování

Výsledky jsme statisticky zpracovávali a grafy vytvářeli v programech MedCalc a Microsoft Excel. Pro posouzení reprodukovatelnosti výsledků jsme u jednotlivých metod z několika opakovaně připravených vzorků stanovili koeficient opakovatelnosti podle Blanda a Altmana. Metody jsme porovnávali též analýzou podle Blanda a Altmana stanovující 95% limity shody (Bland et Altman, 2010). Podle aktuálních doporučení pro použití této metody jsme testovali normalitu rozložení rozdílů (Giavarina, 2015), a to pomocí Shapiro-Wilkova testu. Pro porovnání jsme u vzorků, u nichž jsme poměr inaktivace chromozomů X stanovovali opakovaně stejnou metodou, použili vždy výsledky prvního měření.

4 Výsledky

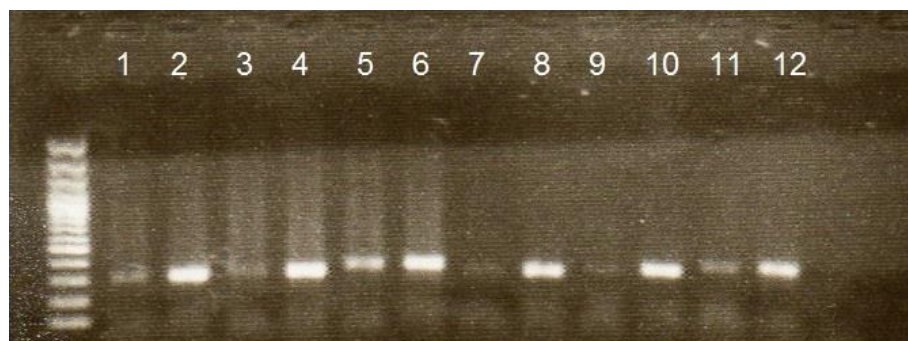
4.1 Metody založené na methylačně senzitivní restrikci

4.1.1 Optimalizace

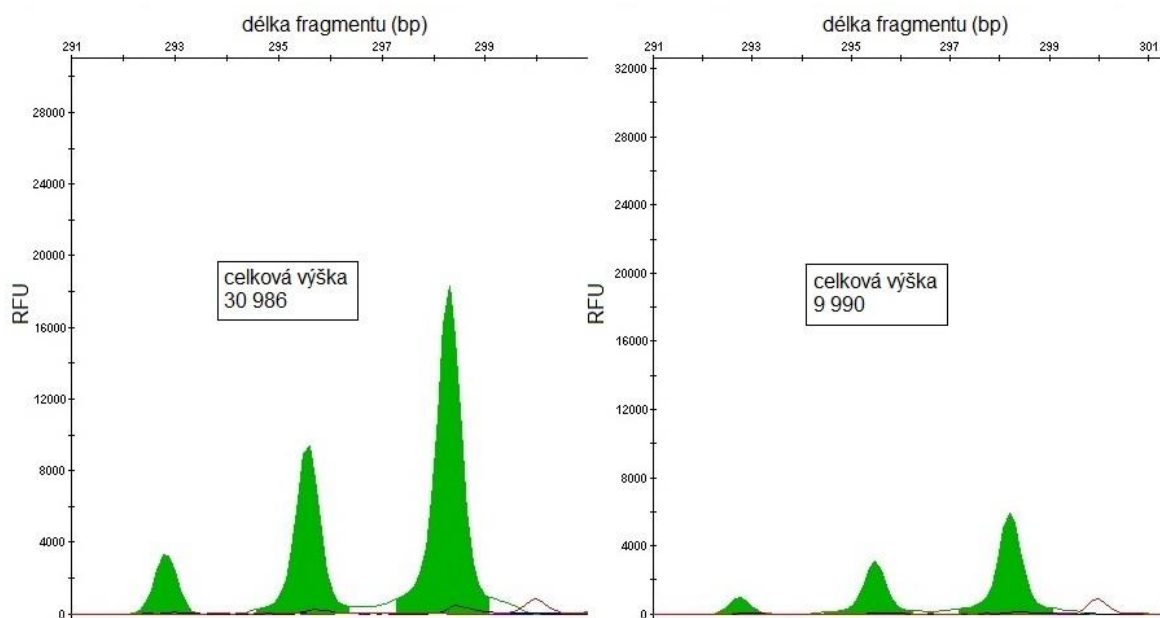
Prvním krokem, který bylo potřeba v rámci této práce provést, byla optimalizace metod využívajících methylačně senzitivní restrikci k aktuálnímu použití v laboratoři. Při postupu podle protokolů pro lokusy *AR*, *CNKS2*, *TMEM185A* a *HMGB3*, které byly v laboratoři dříve využívány a poskytovaly dobré výsledky, totiž opakovaně docházelo k nedokonalému rozštěpení mužského kontrolního vzorku a stanovené hodnoty tedy nebylo možné považovat za validní. V případě lokusů *TMEM185A* a *HMGB3* se navíc u některých vzorků vyskytly problémy s amplifikací. Výměna chemikálií za nové v tomto směru nepřinesla uspokojivé výsledky.

Zásadním faktorem ovlivňujícím úspěšnost restrikce se ukázal být postup zvolený pro izolaci DNA (obrázek 6). Původně použitou sadu a protokol na izolaci Nucleo Spin Dx Blood od společnosti MACHEREY-NAGEL jsme nahradili sadou QIAamp DNA Blood Mini Kit od firmy QIAGEN. K lepším výsledkům jsme též dospěli snížením množství použité DNA z 200 ng na 100 ng a zvětšením objemu, ve kterém štěpení probíhá, z 10 µl na 25 µl (obrázky 7 a 8).

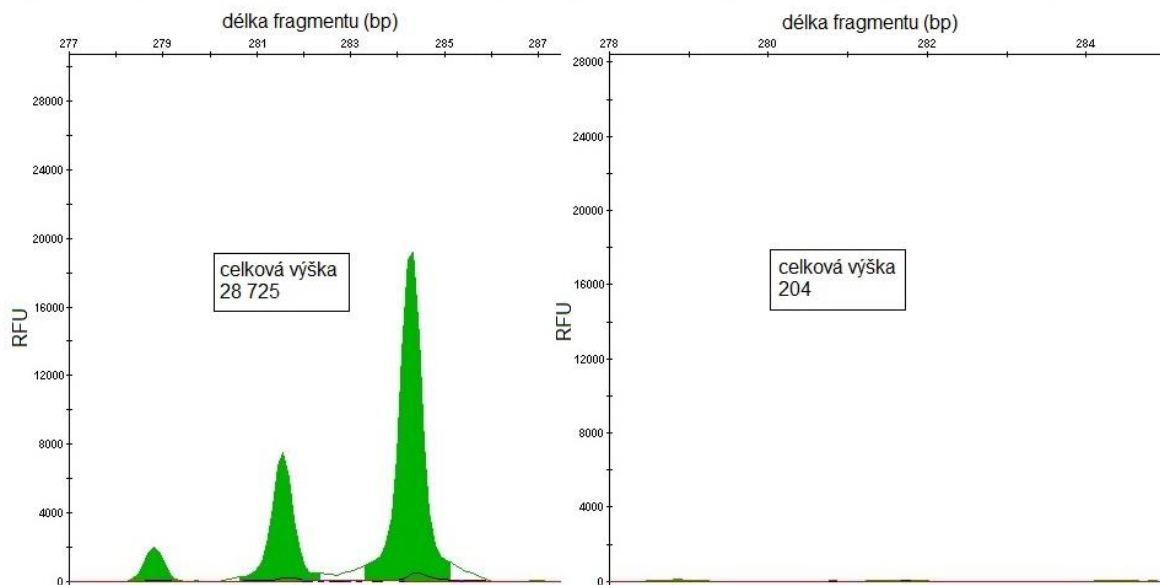
V případě lokusů *TMEM185A* a *HMGB3*, jejichž protokol využívá jinou pomocnou restriktázu oproti lokusům *AR* a *CNKS2*, jsme se i po výše provedených změnách stále potýkali se špatnou amplifikací některých vzorků. Tyto protokoly jsme se proto i z důvodu lepší informativnosti rozhodli v naší práci nahradit testem pro lokus *RP2*.



Obr. 6: Výsledky optimalizace štěpení mužské DNA na gelové elektroforéze; liché vzorky štěpené, sudé neštěpené, 1 – 6 reakce v 10 µl, 200 ng DNA, 7 – 12 reakce v 50 µl, 200 ng DNA; 1 – 4 a 7 – 10 izolace QIAamp, 5, 6, 11 a 12 izolace Nucleo Spin



Obr. 7: Výsledky fragmentační analýzy vzorku mužské kontroly, DNA izolována a štěpena podle původního protokolu pro lokus *AR* (izolace Nucleo Spin Dx Blood, 200 ng DNA, objem reakce 10 μ l). Vlevo vzorek neštěpený HpaII, vpravo vzorek štěpený. RFU – relativní fluorescenční jednotky, bp – pár bází



Obr. 8: Výsledky fragmentační analýzy vzorku mužské kontroly, DNA izolována a štěpena podle současného protokolu pro lokus *AR* (izolace QIAamp DNA Blood Mini Kit, 100 ng DNA, objem reakce 25 μ l). Vlevo vzorek neštěpený HpaII, vpravo vzorek štěpený.

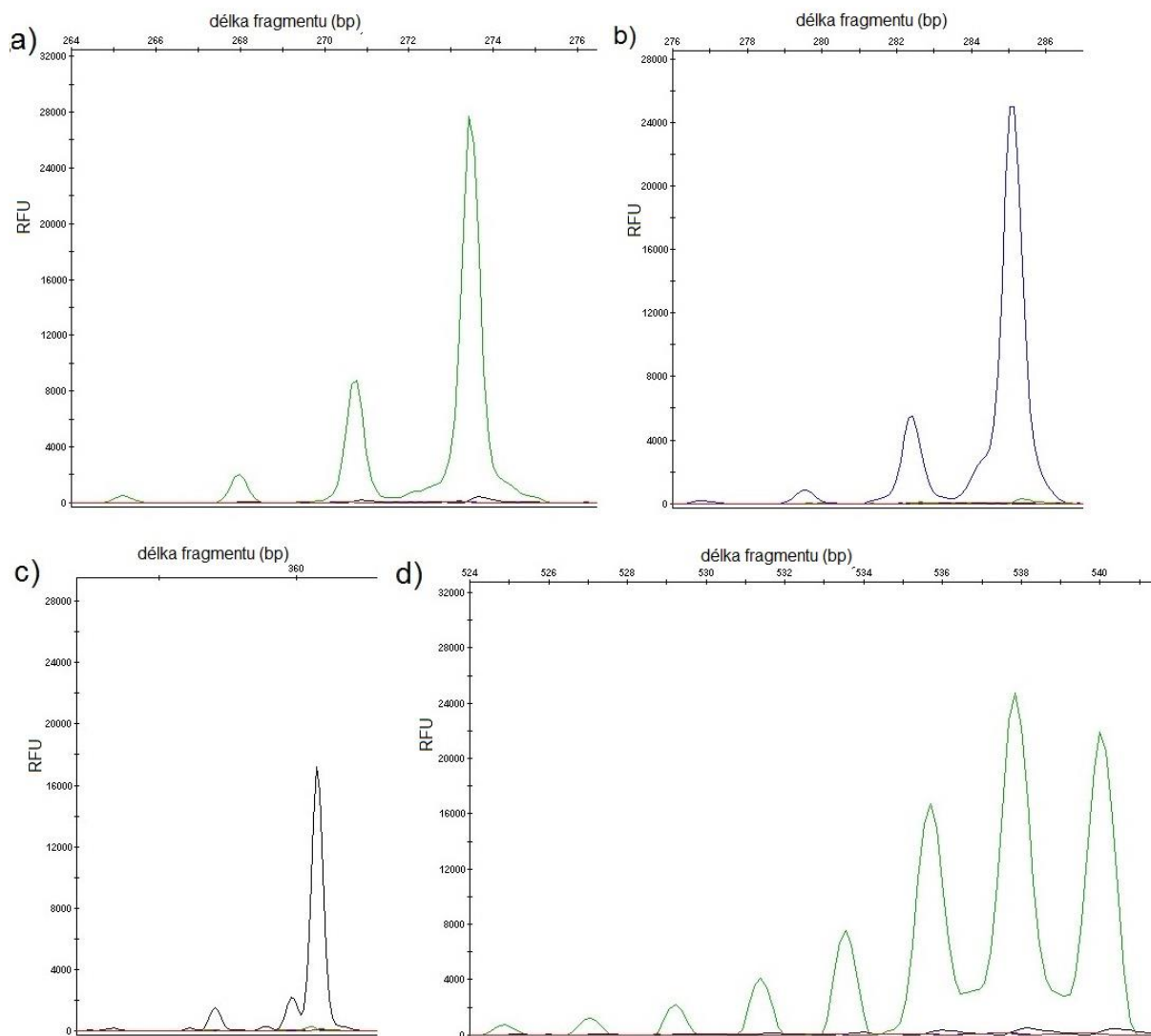
4.1.2 Informativnost a chybovost při amplifikaci

V lokusu *AR* jsme vyšetřili všech 54 žen, jejichž vzorky jsme měli k dispozici. Při odečítání výsledků fragmentační analýzy z kapilární elektroforézy jsme pro každou alelu typicky pozorovali jeden výrazný hlavní vrchol a jeho dva nižší „stutter“ vrcholy (obrázek 9a). Za informativní jsme tedy považovali ženy, u nichž byl rozdíl délky mezi alelami alespoň dvě opakování trinukleotidového motivu STR, abychom předešli výraznému ovlivnění výsledku překrývajícími se vrcholy. Informativnost u tohoto lokusu v naší studii dosáhla 69 %.

V případě lokusu *CNKSR2*, jsme též při vyhodnocování fragmentační analýzy obvykle pozorovali dva „stutter“ vrcholy (obrázek 9b). K vyhodnocování jsme tedy přistupovali stejně jako u lokusu *AR*, v lokusu *CNKSR2* bylo z 54 testovaných žen informativních 17 %.

Při vyhodnocování výsledků analýzy u lokusu *RP2* jsme typicky pozorovali jeden hlavní vrchol a jeden nízký „stutter“ vrchol (obrázek 9c). Za informativní jsme tedy považovali ženy, jejichž alely se lišily jedním a více opakováními tetranukleotidového motivu. Z 52 testovaných žen bylo v lokusu *RP2* informativních 71 %.

Pro porovnání byl do grafického znázornění též zařazen výsledek fragmentační analýzy pro lokus *ZDHH15*, který právě kvůli velkému počtu „stutter“ vrcholů nebyl do této práce zařazen (obrázek 9d).

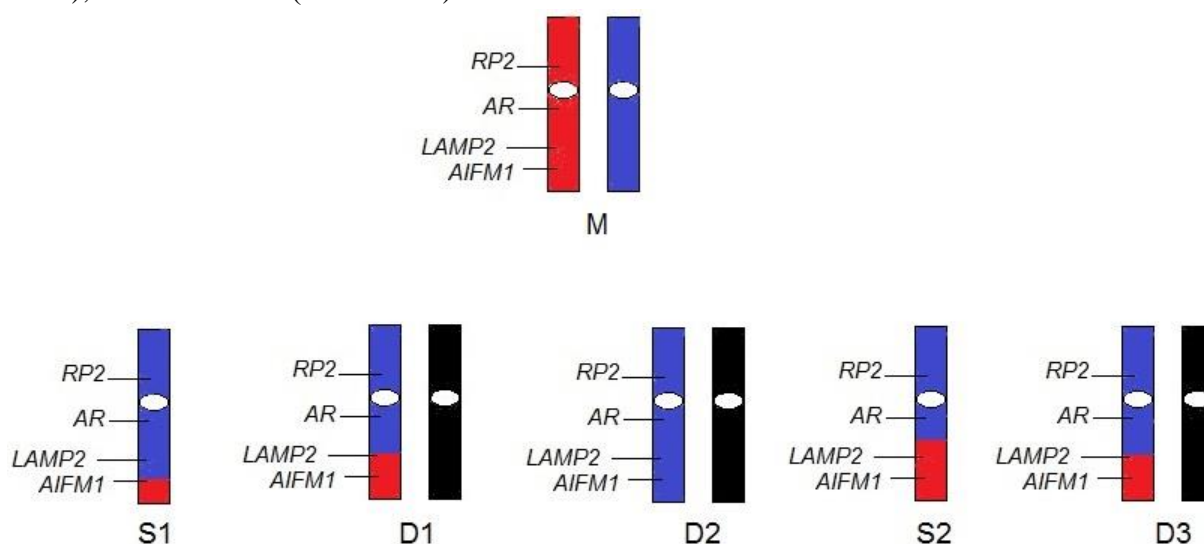


Obr. 9: Typický počet „stutter“ vrcholů pro jednotlivé lokusy u mužské kontroly, a) lokus *AR*, b) lokus *CNKSR2* c) lokus *RP2*, d) pro srovnání lokus *ZDHHC15* s dinukleotidovým STR

4.1.3 Crossing-over

Do naší studie jsme zařadili též matku (M) a její tři dcery (D1 – D3) z rodiny postižené mutací v genu *AIFM1*. Analýzu jsme prováděli jak z DNA izolované z periferní krve, tak z bukalního stěru. Poté co jsme určili poměr inaktivace X_m a X_p za pomoci délky fragmentu u syna S2, jsme oproti očekávání zjistili, že na základě analýzy lokusu *AR* a *RP2* by matka měla mít preferenčně

inaktivovanou nemutovanou alelu a dcery D1 a D3 naopak alelu mutovanou. Rozhodli jsme se tedy u matky a jejích dětí otestovat haplotypy, kvůli případnému crossing-overu. Výsledky získané pomocí sady Elucigene QST*Rplusv2 (protokol v příloze 3) a analýzy polymorfismu *LAMP2* c.156A>T nasvědčují tomu, že u všech dětí s výjimkou dcery D2 došlo mezi lokusy Xq11 - 12, kde leží gen *AR* (Brown et al., 1989), a Xq25 - 26, kde leží *AIFM1* (Susin et al., 1999), k rekombinaci (obrázek 10).



Obr. 10: Schéma haplotypů v rodině postižené mutací v genu *AIFM1*, červeně znázorněna mutovaná alela, modře alela nemutovaná

Podle těchto dat mají tedy všechny testované ženy v rodině, které nesou mutaci, preferenčně inaktivovanou mutovanou alelu a to jak v krvi, tak v bukalním stěru (tabulka 14).

Tab. 14: Zjištěné poměry inaktivace v lokusech *AR* a *RP2* u žen z rodiny postižené mutací genu *AIFM1*, červeně je označena mutovaná alela při zohlednění rekombinace, x – neinformativní lokus

	krev		bukální stěr	
	<i>AR</i>	<i>RP2</i>	<i>AR</i>	<i>RP2</i>
M	99:1	100:0	89:11	89:11
D1	1:99	x	13:87	x
D2	x	81:19	x	55:45
D3	7:93	5:95	26:74	30:70

4.2 Porovnání metod

4.2.1 Opakovatelnost

Variabilitu výsledků zjištěných opakovaným měřením pomocí jedné metody, a tedy její reprodukovatelnost, jsme hodnotili pomocí koeficientu opakovatelnosti. Ten jsme určili na základě vzorků, u nichž byl poměr inaktivace chromozomů X stanoven dvakrát za stejných podmínek, stejnou osobou avšak s krátkým časovým odstupem. Koeficienty opakovatelnosti jsme neurčili u metod založených na methylačně senzitivní restrikci v lokusu *CNKS2* a kvantifikaci transkriptu genu *ABCD1*, a to z důvodu malého počtu vzorků, ze kterých bylo možné vycházet. Koeficienty opakovatelnosti, průměrný rozdíl zjištěných hodnot a počet vzorků, ze kterého jsme při stanovení vycházeli, jsou uvedeny v tabulce 15 (přehled všech naměřených hodnot v příloze 2).

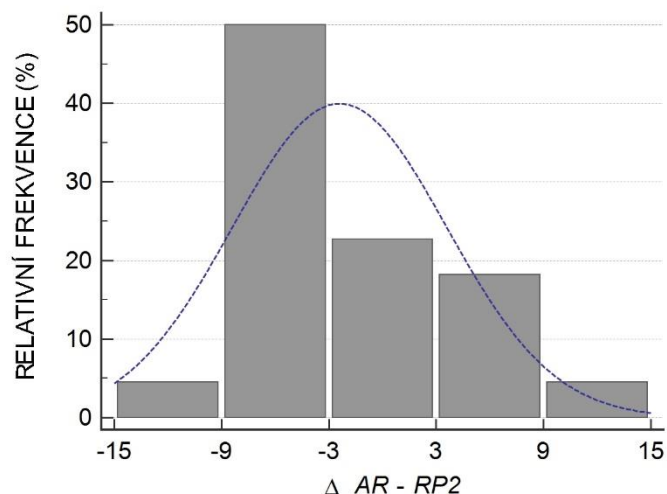
Tab. 15: Koeficienty opakovatelnosti (CR) pro jednotlivé metody

lokus	n	Ø rozdíl	CR
<i>AR</i>	12	0,4 %	9,3 %
<i>RP2</i>	10	-0,1 %	6,6 %
<i>LAMP2</i>	11	0,5 %	4,4 %
<i>IDS</i>	9	0,4 %	2,7 %

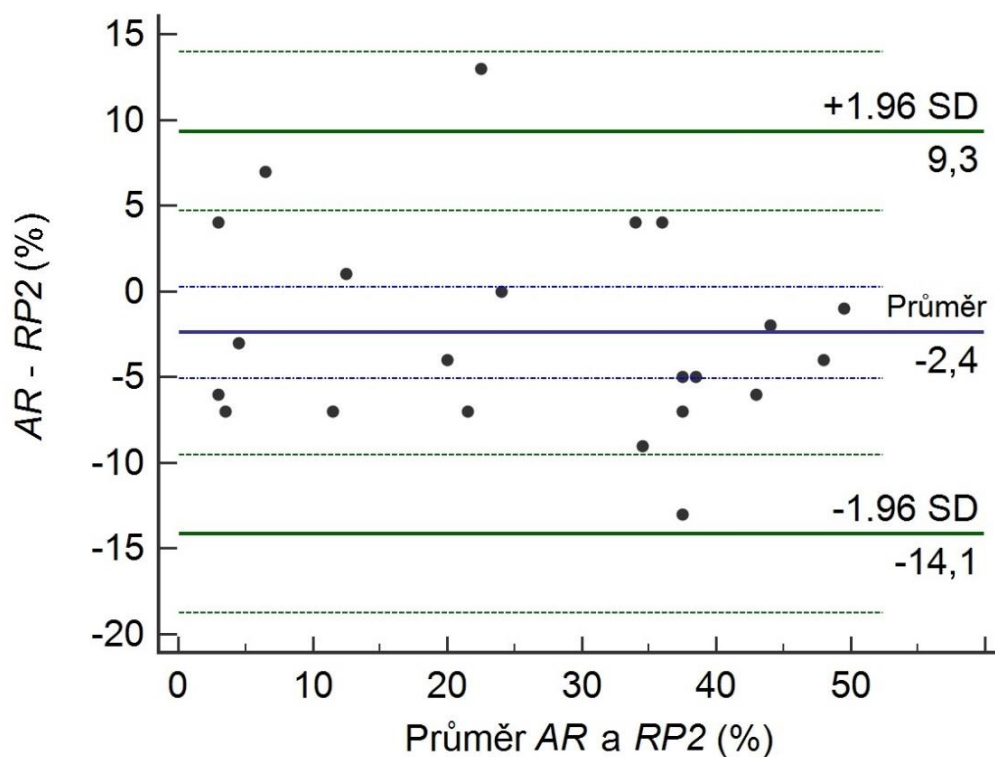
4.2.2 Metody založené na methylačně senzitivní restrikci

Vzhledem k tomu, že nebylo možné spolehlivě určit gametickou fázi u většiny žen, zvolili jsme při porovnání metod vyjádření poměrů inaktivace chromozomů X ve formě procenta odlišení od poměru 50:50, tedy 0 % jako inaktivace zcela náhodná (poměr 50:50) a 50 % jako absolutní zešíkmení X inaktivace (poměr 100:0).

Při porovnání výsledků získaných pro lokusy *AR* a *RP2* jsme vycházeli z hodnot 22 žen, které byly informativní v obou lokusech. Shapiro-Wilkův test normality potvrdil normální rozdělení hodnot rozdílů, $W = 0,94$ a $p = 0,22$. Histogram rozložení rozdílů je znázorněn na obrázku 11. Diagram znázorňující shodu obou metod podle Blanda a Altmana je na obrázku 12 a hodnoty jej popisující v tabulce 16.



Obr. 11: Histogram distribuce rozdílů pro lokusy *AR* a *RP2*, tmavě modrá linie znázorňuje ideální normální rozložení

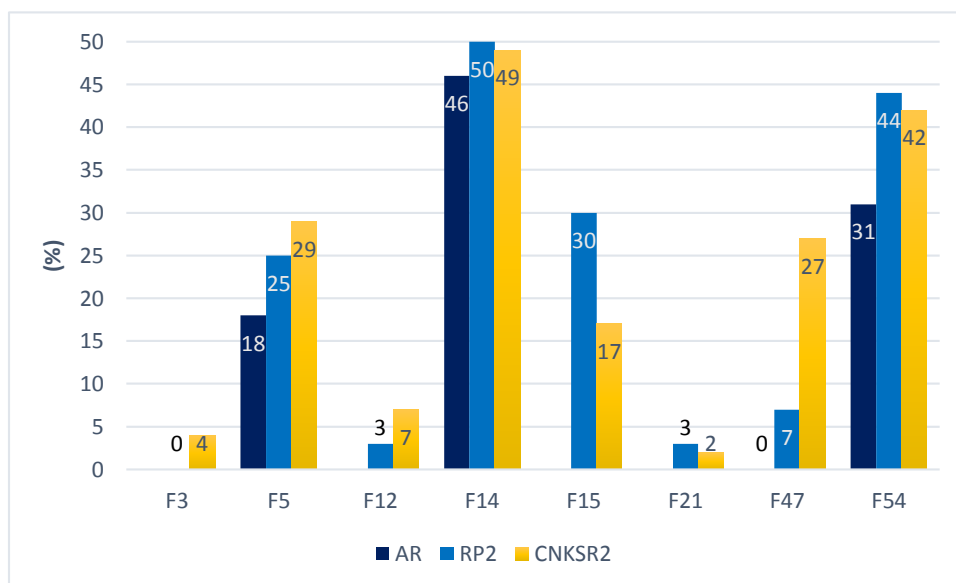


Obr. 12: Diagram shody podle Blanda a Altmana pro lokusy *AR* a *RP2*, modrá přímka znázorňuje průměrný rozdíl, zelené limity shody a přerušované 95% konfidenční intervaly; SD – směrodatná odchylka

Tab. 16: Hodnoty popisující diagram shody pro lokusy *AR* a *RP2*, CI – konfidenční interval

směrodatná odchylka	5,9 %
průměrný rozdíl	-2,4 %
95% CI průměru	-5,1 % až 0,3 %
spodní limit shody	-14,1 %
95% CI spodního limitu	-18,8 % až -9,5 %
horní limit shody	9,3 %
95% CI horního limitu	4,7 % až 13,9 %

Z 9 žen informativních v lokusu *CNKSR2* bylo 8 informativních také v lokusu *RP2* a pouze 4 pro metodu HUMARA. Z důvodu takto malého počtu vzorků, jsme se rozhodli pro porovnání využít jednoduchý sloupcový graf (obrázek 13). Průměrný rozdíl hodnot mezi lokusy *AR* a *CNKSR2* byl -13 %, SD = 10 %. Průměrný rozdíl hodnot mezi lokusy *RP2* a *CNKSR2* byl -1,9 %, SD = 9,2 %.

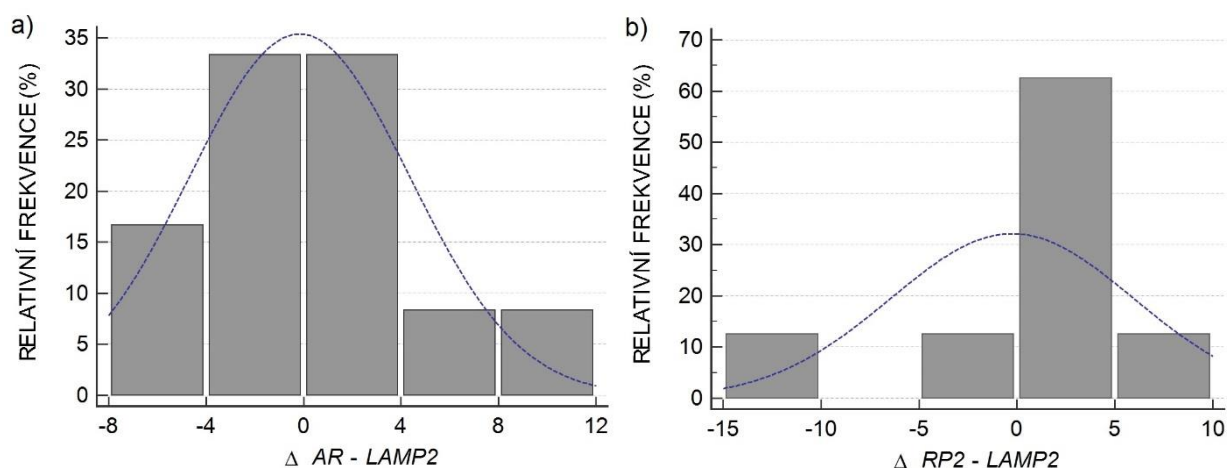


Obr. 13: Porovnání hodnot poměrů inaktivace chromozomů X zjištěných v lokusech *AR*, *RP2* a *CNKSR2*

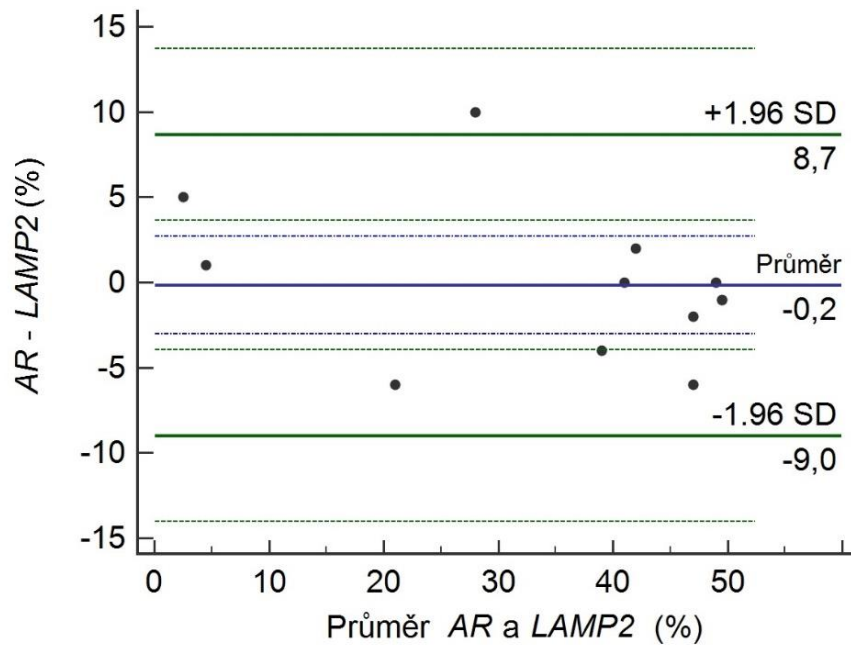
4.2.3 Analýza transkriptu a methylace v lokusech *AR* a *RP2*

Při porovnání metody kvantifikující transkript pomocí paralelního sekvenování s metodami založenými na methylačně senzitivní restrikci v lokusech *AR* a *RP2* jsme opět stanovené hodnoty vyjadřovali jako procento odlišení od poměru 50:50.

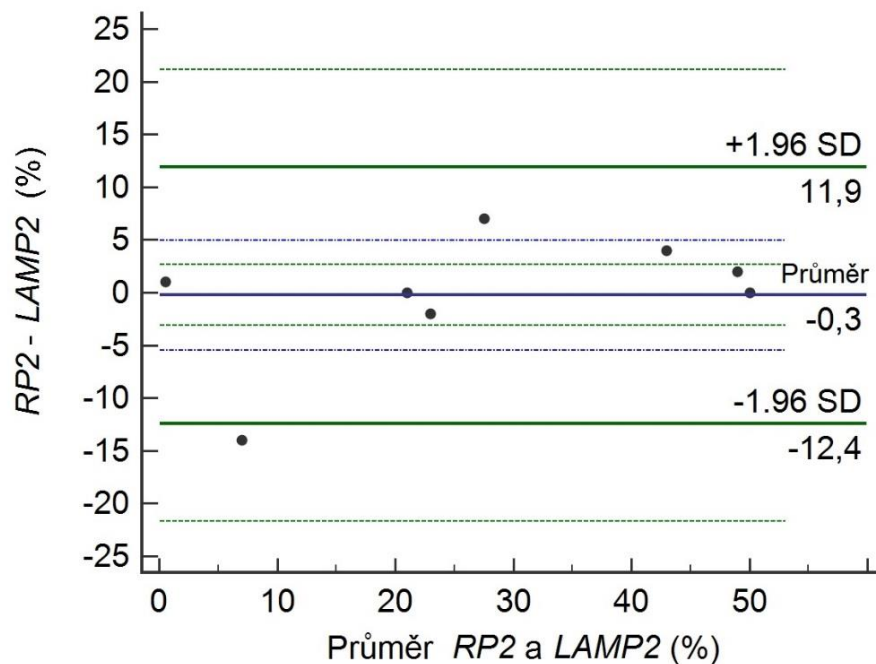
Pro polymorfismus v genu *LAMP2* bylo informativních 18 z 29 testovaných žen (tedy 62 %), přičemž porovnat stanovené hodnoty bylo možné u 12 žen informativních také v lokusu *AR*, respektive 8 žen informativních v lokusu *RP2*. Shapiro-Wilkův test potvrdil normální rozložení rozdílů jak pro porovnání s metodou HUMARA ($W = 0,93$; $p = 0,38$), tak pro porovnání s výsledky pro lokus *RP2* ($W = 0,84$; $p = 0,07$). Histogramy rozložení rozdílů jsou znázorněny na obrázku 14. Diagramy zobrazující shodu metod podle Blanda a Altmana jsou na obrázcích 15 a 16 a hodnoty je popisující v tabulce 17.



Obr. 14: Histogram distribuce rozdílů a) pro polymorfismus v *LAMP2* a lokus *AR*, b) pro polymorfismus v *LAMP2* a lokus *RP2*, tmavě modrá linie znázorňuje ideální normální rozložení



Obr. 15: Diagram shody podle Blanda a Altmana pro polymorfismus v *LAMP2* a lokus *AR*, modrá přímka znázorňuje průměrný rozdíl, zelené limity shody a přerušované 95% konfidenční intervaly

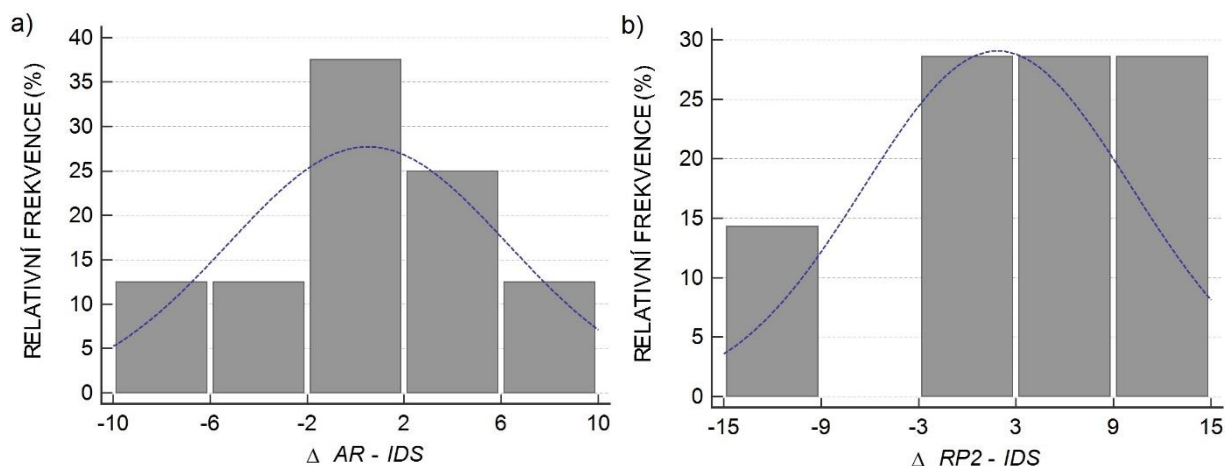


Obr. 16: Diagram shody podle Blanda a Altmana pro polymorfismus v *LAMP2* a lokus *RP2*, modrá přímka znázorňuje průměrný rozdíl, zelené limity shody a přerušované 95% konfidenční intervaly

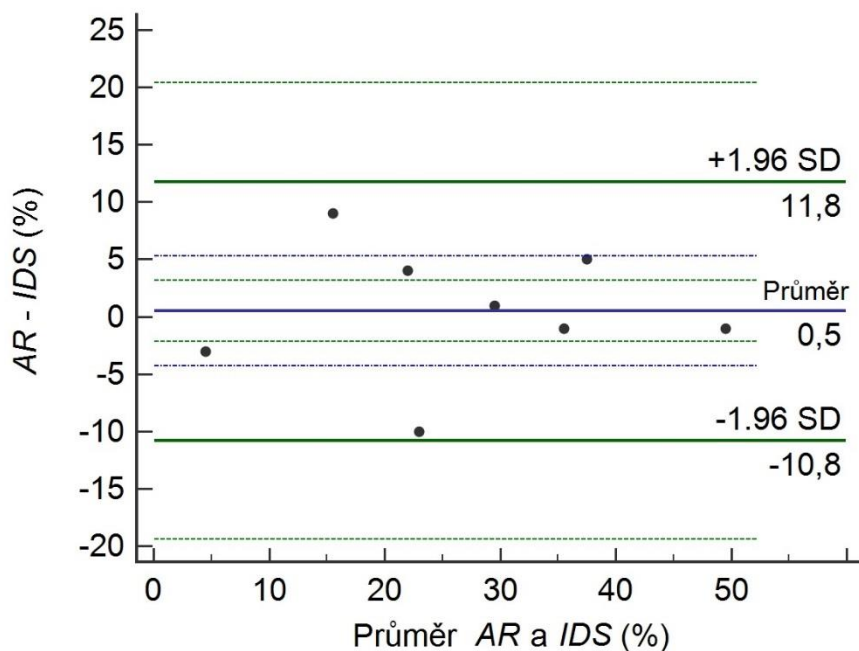
Tab. 17: Hodnoty popisující diagramy shody pro polymorfismus v *LAMP2* a lokusy *AR* a *RP2*

	<i>LAMP2</i> vs <i>AR</i>	<i>LAMP2</i> vs <i>RP2</i>
směrodatná odchylka	4,5 %	6,2 %
průměrný rozdíl	-0,2 %	-0,3 %
95% CI průměru	-3 % až 2,7 %	-5,4 % až 4,9 %
spodní limit shody	-9 %	-12,4 %
95% CI spodního limitu	-14 % až -4 %	-21,7 % až 3,1 %
horní limit shody	8,7 %	11,9 %
95% CI horního limitu	3,6 % až 13,7 %	2,6 % až 21,2 %

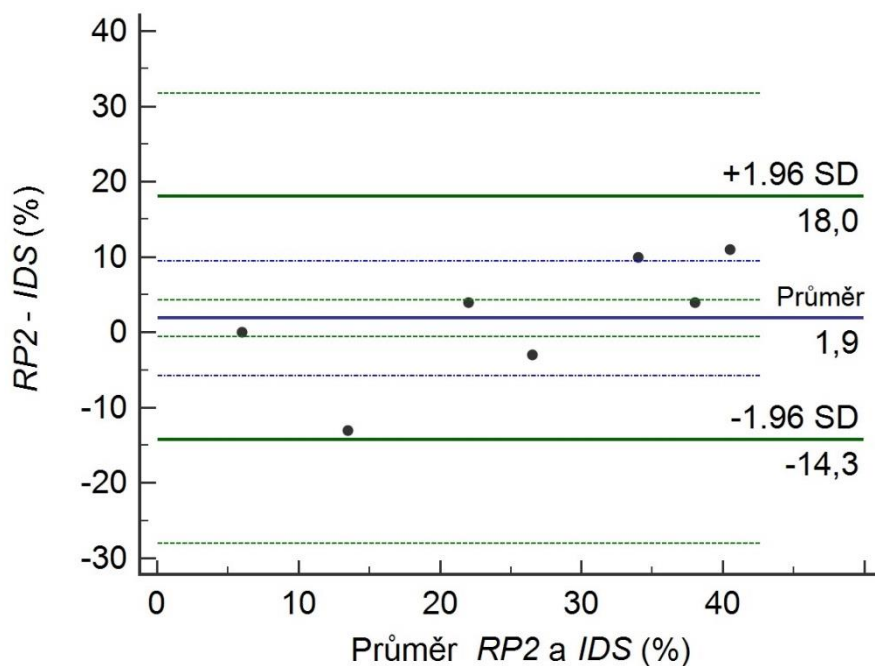
Celkem 40 % žen z 25 testovaných bylo v naší skupině heterozygotních v polymorfismu *IDS* c.438C>T. Z tohoto počtu bylo 8 informativních také v lokusu *AR* a u 7 bylo možné srovnání s výsledky pro lokus *RP2*. Normální rozložení rozdílů pro obě porovnání jsme opět potvrdili pomocí Shapiro-Wilkova testu (porovnání s lokusem *AR*: $W = 0,97$; $p = 0,91$; porovnání s lokusem *RP2*: $W = 0,93$; $p = 0,56$). Histogramy rozložení rozdílů jsou znázorněny na obrázku 17. Diagramy zobrazující shodu metod podle Blanda a Altmana jsou na obrázcích 18 a 19 a hodnoty je popisující v tabulce 18.



Obr. 17: Histogram distribuce rozdílů a) pro polymorfismus v *IDS* a lokus *AR*, b) pro polymorfismus v *IDS* a lokus *RP2*, tmavě modrá linie znázorňuje ideální normální rozložení



Obr. 18: Diagram shody podle Blanda a Altmana pro polymorfismus v *IDS* a lokus *AR*, modrá přímka znázorňuje průměrný rozdíl, zelené limity shody a přerušované 95% konfidenční intervaly

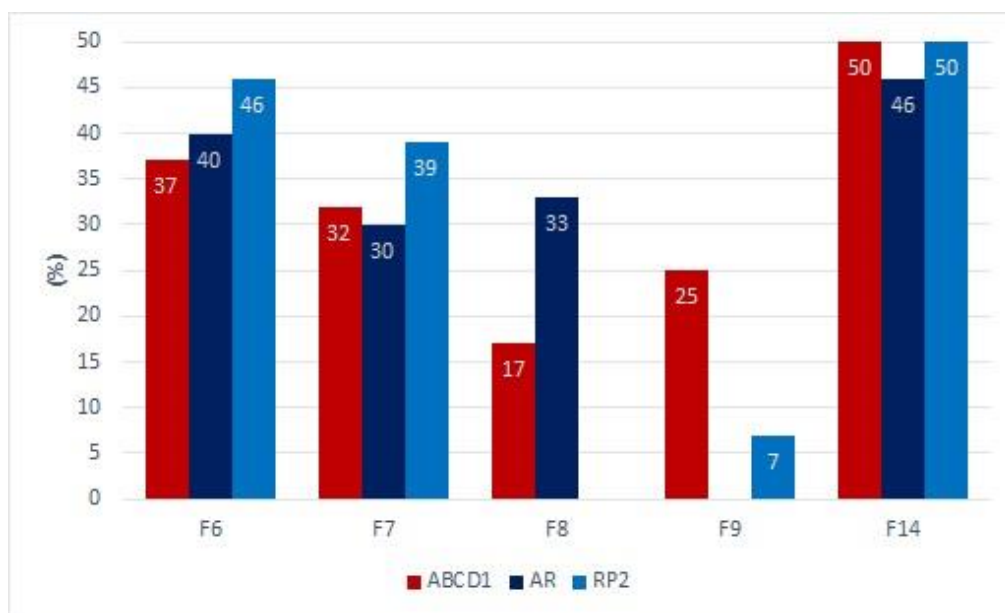


Obr. 19: Diagram shody podle Blanda a Altmana pro polymorfismus v *IDS* a lokus *AR*, modrá přímka znázorňuje průměrný rozdíl, zelené limity shody a přerušované 95% konfidenční intervaly

Tab. 18: Hodnoty popisující diagramy shody pro polymorfismus v genu *IDS* a lokusy *AR* a *RP2*

	<i>IDS</i> vs <i>AR</i>	<i>IDS</i> vs <i>RP2</i>
směrodatná odchylka	5,8 %	8,2 %
průměrný rozdíl	0,5 %	1,9 %
95% CI průměru	-4,3 % až 5,3 %	-5,8 % až 9,5 %
spodní limit shody	-10,8 %	-14,3 %
95% CI spodního limitu	-19,4 % až -2,2 %	-28 % až 0,6 %
horní limit shody	11,8 %	18 %
95% CI horního limitu	3,2 % až 20,4 %	4,3 % až 31,7 %

Heterozygotitu pro polymorfismus *ABCD1* c.1548G>A jsme testovali u 12 žen z naší skupiny, přičemž informativních bylo 5 (tedy 42 %). Pro orientační porovnání výsledků s methylačně senzitivní restrikcí v lokusech *AR* a *RP2* jsme proto opět zvolili jednoduché grafické znázornění pomocí sloupcového grafu (obrázek 20). Průměrný rozdíl hodnot pro lokus *AR* a polymorfismus v genu *ABCD1* byl 3,3 %, SD = 9 % Průměrný rozdíl pro lokus *RP2* a polymorfismus v *ABCD1* byl -0,5 %, SD = 12,3 %.

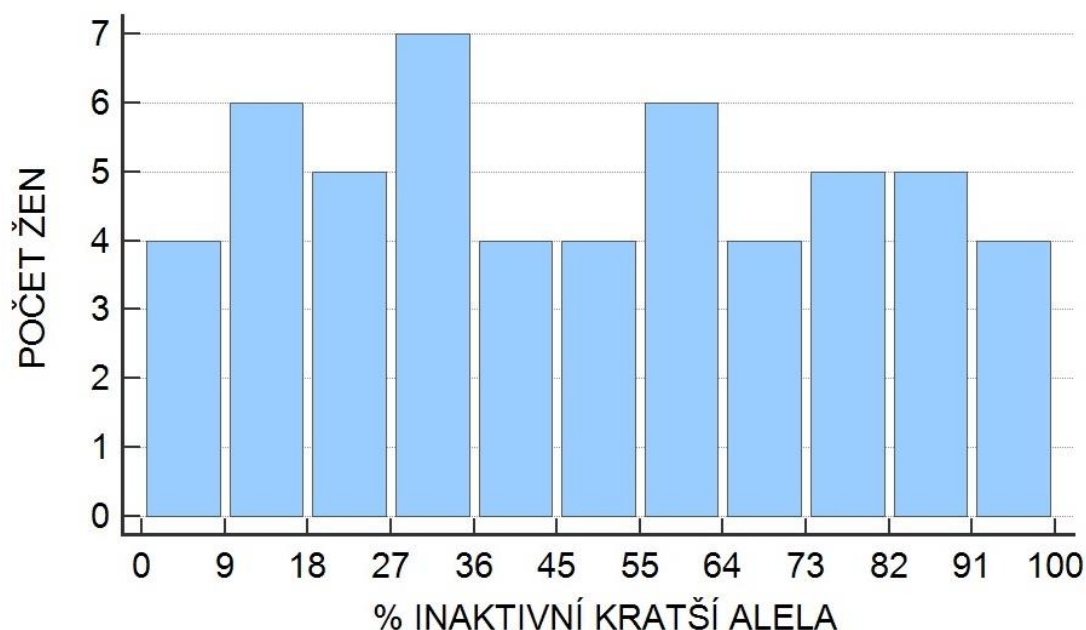


Obr. 20: Porovnání hodnot poměrů inaktivace chromozomů X stanovených metodou kvantifikující transkript v genu *ABCD1* a methylaci v lokusech *AR* a *RP2*

4.3 Rozložení poměrů inaktivace chromozomů X

Pro účely studia rozložení poměrů inaktivace chromozomů X v rámci celé skupiny žen jsme použili průměr hodnot získaných pro všechny lokusy i polymorfismy včetně opakovaných měření. Z důvodu nejasné gametické fáze jsme výsledky sdružovali a průměr stanovovali na základě nejlepší shody hodnot. Jako výchozí tkáň byla ve všech případech použita periferní krev. Poměr inaktivace jedné alely ku druhé jsme tak stanovili u všech 54 žen.

V rámci studované skupiny žen jsme zjistili zešíkmení X inaktivace v poměru $< 20:80$ nebo $> 80:20$ u 39 % z nich. Extrémní zešíkmení v poměru $< 5:95$ nebo $> 95:5$ jsme zaznamenali u 11 % žen. Průměrná hodnota poměru inaktivace byla 49:51 se směrodatnou odchylkou $SD = 29$, medián se nacházel v bodě 47:53 (za první hodnotu bylo vždy považováno procento inaktivace kratší alely v lokusu *AR*, či *RP2*, pokud HUMARA nebyla informativní). Rozložení v rámci celé skupiny je znázorněno v histogramu na obrázku 21.



Obr. 21: Rozložení poměru inaktivace chromozomů X ve skupině 54 žen

5 Diskuze

V naší práci jsme stanovili poměr inaktivace chromozomů X u 54 žen a to pomocí methylačně senzitivní restrikce v lokusech *AR*, *CNKS2*, *RP2* a kvantifikace transkriptu s využitím polymorfismů *LAMP2* c.156A>T, *IDS* c.438C>T a *ABCD1* c.1548G>A. Na základě těchto analýz jsme dospěli k následujícím poznatkům.

Z důvodu opakovaného nedokonalého rozštěpení vzorků mužské kontroly a to až k hodnotám, kdy součet výšek vrcholů štěpeného vzorku přesahoval 30 % součtu výšek vzorku neštěpeného enzymem HpaII, jsme v první fázi vypracování této práce optimalizovali původní protokoly. Výrazného zlepšení jsme dosáhli změnou sady na izolaci DNA, zvětšením objemu reakce a snížením množství DNA v reakci. Po optimalizaci protokolu se součet výšek vrcholů štěpeného vzorku vždy pohyboval v rozmezí 0 – 6 % součtu výšek vrcholů vzorku neštěpeného. Výrobce uvádí, že restrikční enzym HpaII může být inhibován solemi v koncentraci vyšší než 50 mM KCl, přičemž při izolaci DNA na kolonkách se silikátovou membránou může docházet k přenesení významného množství soli do výsledného roztoku DNA (URL4). Za předpokladu, že nedokonalé rozštěpení kontrol bylo v našem případě způsobeno právě přítomností soli, která inhibovala restriktazu, v roztoku, pro což by svědčilo zlepšení výsledků po zvětšení reakčního objemu a snížení vstupního množství DNA, lze usuzovat, že při použití sady QIAamp DNA Blood Mini Kit od firmy QIAGEN dochází k přenosu menšího množství soli do výsledného roztoku oproti sadě Nucleo Spin Dx Blood od společnosti MACHEREY-NAGEL. Tuto domněnku by však bylo vhodné potvrdit dalšími měřeními. Problémy s amplifikací, které jsme pozorovali u některých vzorků při použití protokolů pro lokusy *TMEM185A* a *HMGB3*, mohly být způsobeny štěpením pomocného enzymu HpyCH4III mimo jeho rozpoznávací sekvenci.

Jako informativní jsme v případě metod založených na methylaci v naší studii označovali ženy, u nichž byl rozdíl délky alel takový, aby při vyhodnocování byly výsledky co nejméně zkresleny případným překryvem vrcholů. U trinukleotidových STR lokusů *AR*, s motivem (CAG)_n (Allen et al., 1992) a *CNKS2*, s motivem (GCA)_n (Musalkova et al., 2015), jsme tuto hranici stanovili jako dvě a více opakování motivu, neboť „stutter“ vrchol ve vzdálenosti -6 bp od hlavního vrcholu typicky nedosahoval takové výšky, která by měla vliv na výsledný poměr. U lokusu *RP2*, který obsahuje tetranukleotidový STR (GAAA)_n (Machado et al., 2014), jsme za

dostačující pokládali rozdíl v délce jednoho motivu. Všechny tři použité testy v naší laboratoři vykazovaly podstatně menší počet „stutter“ vrcholů, a tudíž poskytovaly výsledky, které byly snáze vyhodnotitelné a robustnější, než STR s diknukleotidovým motivem.

Z tří použitých testů založených na methylačně senzitivní restrikci v našem souboru žen vykazoval nejvyšší informativnost lokus *RP2*, a to 71 %, což se blíží hodnotě zjištěné autory Machado a kolektiv ve skupině 60 holandských žen, z nichž bylo informativních 73 % (Machado et al., 2014). V nejčastěji používaném lokusu *AR* bylo v naší studii informativních 69 % žen. Pro srovnání v doposud největší provedené studii X inaktivace s 1284 ženami různého původu bylo možné poměr inaktivace vyhodnotit u 78 % z nich (Amos-Landgraf et al., 2006). Podle očekávání bylo nejméně žen informativních v lokusu *CNKSR2*, konkrétně 17 %, což odpovídá 18 % uvedeným v původní publikaci, jejíž autoři inaktivaci studovali u stovky českých žen (Musalkova et al., 2015). Naše výsledky jsou tak ve shodě a podporují hodnoty zjištěné jinými autory. Všechny polymorfismy použité pro kvantifikaci transkriptu poskytly velmi dobrou informativnost. Ve shodě s naším očekáváním, založeným na pozorované frekvenci výskytu jednotlivých alel v populaci (1000 Genomes Project Consortium et al., 2015), nejvyšší heterozygotitu (62 %) vykazoval polymorfismus *LAMP2* c.156A>T. Polymorfismy *IDS* c.438C>T a *ABCD1* c.1548G>A byly informativní u 40 %, respektive 42 %, testovaných žen. V případě polymorfismu v *ABCD1* jsme však vycházeli z více než o polovinu menšího souboru než u ostatních dvou genů a nad očekávání vysoká pozorovaná heterozygotita tak může být způsobena vlivem náhody. Nezbytné je také poznamenat, že řada žen v naší studii byla příbuzných, což je další faktor, který by mohl být příčinou odlišností, pokud bychom stanovené hodnoty srovnávali s celkovou populací.

Studium haplotypů v rodině postižené mutací v genu *AIFM1* potvrdilo, že crossing-over je významným faktorem, který by neměl být opomenut, pokud chceme zešíkmení X inaktivace asociovat s projevy onemocnění a to zejména v případech, kdy gen nesoucí mutaci a markerový lokus jsou od sebe výrazně vzdáleny. V tomto ohledu velkou výhodou metod založených na kvantifikaci transkriptu včetně metody využívající paralelní sekvenování je možnost využít k testování přímo místo mutace. U námi vyšetřované rodiny došlo mezi oblastmi Xq11 – 12 a Xq25 – 26 k rekombinaci u čtyřech z pěti potomků matky a to nejméně ve třech různých lokusech. Pokud bychom tedy alelické fáze určovali pouze na základě methylačně senzitivní

restrikce v lokusu *AR*, naše závěry by byly chybné. U všech žen v této rodině, které nesou mutovanou alelu genu *AIFM1*, si lze též povšimnout extrémního zešíkmení X inaktivace v krvi, přičemž zešíkmení v bukalním stěru ve všech případech není natolik výrazné. Toto pozorování je ve shodě s dříve publikovanou prací autorů Ghezzi a kolektiv a jejich závěry, že vliv mutace v genu *AIFM1* na zešíkmení X inaktivace je variabilní v různých typech tkání (Ghezzi et al., 2010).

Námi stanovené koeficienty opakovatelnosti poukazují na rozdíl ve variabilitě opakovaných měření mezi metodami založenými na methyloaci a kvantifikací transkriptu pomocí paralelního sekvenování s hloubkou čtení více než 1 000x. Výsledek pro lokus *AR* byl výrazně ovlivněn přítomností jediného vzorku, u kterého rozdíl mezi opakovanými měřeními přesahoval 10 %, i variabilita u ostatních vzorků však byla vyšší než u metody analyzující transkript. Poměrně vysoká variabilita hodnot stanovených v lokusech *AR* a *RP2* ($CR_{AR} = 9,3 \%$, respektive $CR_{RP2} = 6,6 \%$) může být zapříčiněna jednak neúplným rozštěpením vzorku, neboť i přes kontrolu štěpení v podobě mužského vzorku nemusí štěpení v každé zkumavce probíhat se stejnou účinností, či rozdíly v nerovnoměrné amplifikaci alel mezi vzorkem štěpeným *HpaII* a neštěpeným. Pozorované rozdíly a stanovené koeficienty opakovatelnosti pro metodu kvantifikující transkript pomocí polymorfismů v genech *LAMP2* a *IDS* ($CR_{LAMP2} = 4,4 \%$ a $CR_{IDS} = 2,7 \%$) jsou relativně nízké, nelze však vyloučit možnost, že u některých žen systematicky dochází k nerovnoměrné amplifikaci během PCR. To se neprojeví na stanoveném koeficientu opakovatelnosti, nicméně vyhodnocený poměr inaktivace chromozomů X tak nebude odpovídat skutečnému stavu.

Lze předpokládat, že vyšší koeficienty opakovatelnosti u metod založených na methyloaci jsou také příčinou poměrně širokého intervalu shody v rozsahu téměř 24 % při porovnání výsledků pro lokusy *AR* a *RP2*. Vzhledem k velikosti souboru, ze kterého jsme vycházeli, jsou limity shody ve velké míře ovlivněny hodnotami dvou žen, u nichž rozdíl ve výsledcích činil více než 10 %. Ovšem i neoptimističtější možná interpretace 95% konfidenčních intervalů limitů shody poskytuje interval shody v rozsahu téměř 15 %. Nicméně na základě normálního rozložení rozdílů, které jsme potvrdili Shapiro-Wilkovým testem normality a faktu, že 95% konfidenční interval průměrné hodnoty rozdílu se pohybuje okolo hodnoty 0, lze usuzovat, že jedna metoda oproti druhé výrazným způsobem nepodhodnocuje či nenadhodnocuje.

Při porovnání výsledků ze všech tří lokusů testovaných na metylaci lepší shodu s hodnotami stanovenými pro lokus *CNKSR2* vykazoval lokus *RP2* oproti lokusu *AR*. Z důvodu nízké informativnosti v lokusu *CNKSR2* jsme však vycházeli z opravdu velmi omezeného počtu vzorků a na jejich základě proto nelze stanovit přesné závěry.

Výsledky kvantifikace transkriptu v genech *LAMP2* a *IDS* byly u většiny žen ve velmi dobré shodě s hodnotami získanými pomocí metod založených na metylaci. V některých případech jsme však zaznamenali výrazné rozdíly, které se odrazily i na stanovených intervalech shody. Ty měly ve všech případech, s výjimkou srovnání výsledků pro polymorfismus v *IDS* a lokus *RP2*, kde jsme vycházeli z pouhých sedmi vzorků, rozsah okolo 20 %. Stanovené 95% konfidenční intervaly však vzhledem k velikosti souboru poskytují poměrně značný prostor pro interpretaci, vhodné by proto bylo počet vzorků, ze kterých jsme v naší práci vycházeli navýšit. Stanovené směrodatné odchylky, vyjadřující míru variability ve velikosti rozdílů hodnot získaných různými metodami (nejnižší SD = 4,5 % a nejvyšší SD = 8,2 %), jsou srovnatelné s variabilitou pozorovanou autory Busque a kolektiv při srovnání metody HUMARA s metodou kvantifikující transkript pomocí kvantitativní PCR s TaqMan sondami a nižší než směrodatná odchylka pro srovnání metody HUMARA s analýzou transkriptu založenou na alelově specifické PCR (Busque et al., 2009).

Podobně jako v případě metody testující metylaci v lokusu *CNKSR2* i pro analýzu transkriptu v genu *ABCD1* nemáme dostatečný počet vzorků, abychom mohli výsledky získané touto metodou statisticky zpracovat. Nicméně z grafického porovnání vyplývá, že podobně jako u ostatních dvou použitých polymorfismů i v tomto případě byly výsledky většinou v dobré shodě s poměry inaktivace stanovenými pomocí analýzy methylace v lokusech *AR* a *RP2*, avšak v případě dvou žen byly pozorovány hodnoty lišící se o více než 10 %.

Předpokládáme, že hlavní příčinou námi popsanych rozdílů ve výsledcích metod založených na methylačně senzitivní restrikci a na kvantifikaci transkriptu jsou nepřesnosti v měření jednotlivých metod, které diskutujeme již výše v souvislosti se stanovenými koeficienty opakovatelnosti. S určitostí však nemůžeme vyloučit ani případné biologické příčiny jako možnost, že methylace ve studovaných lokusech u některých žen neodpovídá aktivnímu či inaktivnímu statutu celého chromozomu, jak popisují Swierczek a kolektiv (Swierczek et al.,

2012), neboť v případě lokusů *AR* i *RP2* není studována methylace přímo v promotorech genů. Srovnání výsledků metod by taktéž bylo ovlivněno, pokud by geny, které jsme použili ke kvantifikaci transkriptu, unikaly X inaktivaci, přičemž pro geny *LAMP2*, *IDS* i *ABCD1* byly publikovány jak práce popisující částečnou transkripční aktivitu z Xi v těchto genech, tak studie, ve kterých se tyto lokusy zdály být zcela umlčené (Zhang et al., 2013; Balaton et al., 2015). Únik X inaktivaci by mohl být příčinou případů, kdy míra zešíkmení byla na základě analýzy transkriptu nižší než podle metody využívající metylačně senzitivní restriktci. Počet žen v naší skupině, u nichž jsme takovýto rozdíl našli, však není vysoký a výrazně se neliší od počtu žen s opačně orientovaným rozdílem mezi stanovenými hodnotami, na základě předcházejících výzkumů však nelze vyloučit, že gen neuniká inaktivaci jen u některých žen (Cotton et al., 2013).

Polovina z 54 žen, u nichž jsme určili poměr inaktivace chromozomů X, vykazovala náhodné rozložení inaktivace, čemuž odpovídala i průměrná hodnota a medián. Nicméně celých 39 % žen mělo inaktivaci zešíkmenou v poměru vyšším než 80:20, což je o mnoho více než bychom čekali v běžné populaci. Pro srovnání Amos-Landgraf a kolegové ve své studii pozorovali takové zešíkmení pouze u 9 % žen (Amos-Landgraf et al., 2006). Lze předpokládat, že přítomnost takto vysokého podílu žen se zešíkmenou X inaktivací v naší skupině je zapříčiněna tím, že značnou část souboru tvoří ženy heterozygotní pro mutaci způsobující některé z onemocnění uvedených v tabulce 1. Tato mutace může svým charakterem ovlivňovat pravděpodobnost, že chromozom, na kterém leží, bude inaktivní, jako je tomu v případě mutace genu *AIFM1*. Případně může u dané choroby existovat vztah mezi mírou zešíkmení X inaktivace a projevem choroby, jako u MPS II. Nelze však také opomenout fakt, že studovaná skupina je poměrně malá, čímž se zvyšuje vliv náhody.

6 Závěr

V rámci této diplomové práce jsme stanovovali poměr inaktivace chromozomů X u 54 žen na základě methylačně senzitivní restrikce v lokusech *AR* a *CNKS2*, protokoly pro původně zamýšlené další lokusy *TMEM185A* a *HMGB3* se nám nepodařilo uspokojivě optimalizovat a byly proto ze studie vyřazeny a nahrazeny lokusem *RP2*. Dále jsme u 32 z těchto žen, u nichž bylo možné izolovat RNA, použili metodu kvantifikující transkript pomocí paralelního sekvenování za využití polymorfismů *LAMP2* c.156A>T, *IDS* c.438C>T a *ABCD1* c.1548G>A. Na základě výsledků prezentovaných v kapitole 4 této práce jsme dospěli k následujícím závěrům:

- Rozložení poměrů inaktivace chromozomů X ve studované skupině bylo oproti rozložení v běžné populaci výrazně ovlivněno přítomností žen, u nichž X-vázaná mutace zřejmě sekundárně způsobila zešíklení X inaktivace, či ovlivnila symptomatický statut heterozygotky.
- Pro stanovení poměru inaktivace chromozomů X na základě methylačně senzitivní restrikce jsou vhodnější lokusy s opakováním tetra- či alespoň trinukleotidovým, neboť poskytují lépe vyhodnotitelné a robustnější výsledky.
- Při interpretaci výsledků a jejich asociaci se zešíklením ve prospěch mutované či nemutované alely v jiném lokusu je vždy nutné brát v úvahu možnost rekombinace a jako velká výhoda se tedy jeví možnost testování přímo v místě mutace u metod založených na transkriptu.
- Metoda kvantifikující transkript pomocí paralelního sekvenování poskytuje výsledky s nižší variabilitou v opakovaných stanoveních oproti metodám využívajícím metylaci pro lokusy *AR* a *RP2* a lze ji tedy považovat za velmi robustní a spolehlivou.
- Všechny testované metodické přístupy vykazovaly při porovnání obdobný interval shody v rozmezí přibližně 20 % a u většiny žen poskytovaly výsledky v dobré shodě. Žádná z metod oproti ostatním pravděpodobně systematicky nenadhodnocuje, či nepodhodnocuje a považujeme je proto za vhodné pro použití ke stanovení poměru inaktivace chromozomů X.

- Vzhledem k rozdílným výsledkům jednotlivých metod i opakovaných měření, které jsme zaznamenali u některých žen, považujeme za vhodné při stanovení poměru inaktivace chromozomů X vždy vycházet z alespoň dvou měření a v ideálním případě i ze stanovení pomocí různých metod, neboť popsané intervaly shody naznačují, že metodický přístup může významným způsobem ovlivnit interpretaci výsledků.

7 Seznam zkratek

bp	pár bází
BSA	hovězí sérový albumin
cDNA	komplementární DNA
CI	konfidenční interval
CR	koeficient opakovatelnosti
for	přímý primer
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiotreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
HUMARA	analýza methylace lidského androgenního receptoru
LINEs	dlouhé rozptýlené jaderné elementy
MHBD	2-methyl-3hydroxybutyryl-koenzym A dehydrogenáza
MPS II	mukopolysacharidóza II. typu
OTCD	deficit ornitin transkarbamilázy
PAR	pseudoautozomální oblast chromozomu
PBS	fosfátový pufr
PCR	polymerázová řetězová reakce
RCF	relativní centrifugační síla
rev	zpětný primer

RFU	relativní fluorescenční jednotky
RNA	ribonukleová kyselina
rpm	otáčky za minutu
SD	směrodatná odchylka
SNPs	jednonukleotidový polymorfismus
STR	krátké tandemové repetice
TBE	tris-borát-ethylendiamintetraoctan disodný
Xa	aktivní chromozom X
Xi	inaktivovaný chromozom X
XIC	X inaktivační centrum na lidském chromozomu
Xic	X inaktivační centrum na myším chromozomu
XLA	Brutonova agamaglobulinemie, X-vázaná hypogamaglobulinemie
Xm	chromozom X pocházející od matky
Xp	chromozom X pocházející od otce

8 Seznam literatury

- 1000 Genomes Project Consortium, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, Marchini JL, McCarthy S, McVean GA, Abecasis GR. 2015. A global reference for human genetic variation. *Nature* 526:68–74.
- Acuna-Hidalgo R, Bo T, Kwint MP, van de Vorst M, Pinelli M, Veltman JA, Hoischen A, Vissers LELM, Gilissen C. 2015. Post-zygotic Point Mutations Are an Underrecognized Source of De Novo Genomic Variation. *Am J Hum Genet* 97:67–74.
- Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW. 1992. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet* 51:1229–39.
- Amos-Landgraf JM, Cottle A, Plenge RM, Friez M, Schwartz CE, Longshore J, Willard HF. 2006. X chromosome-inactivation patterns of 1,005 phenotypically unaffected females. *Am J Hum Genet* 79:493–9.
- Bailey JA, Carrel L, Chakravarti A, Eichler EE. 2000. Molecular evidence for a relationship between LINE-1 elements and X chromosome inactivation: The Lyon repeat hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6634–6639.
- Balaton BP, Cotton AM, Brown CJ. 2015. Derivation of consensus inactivation status for X-linked genes from genome-wide studies. *Biol Sex Differ* 6:35.
- Barakat TS, Gunhanlar N, Gontan Pardo C, Achame EM, Ghazvini M, Boers R, Kenter A, Rentmeester E, Grootegoed JA, Gribnau J. 2011. RNF12 Activates *Xist* and Is Essential for X Chromosome Inactivation. *PLoS Genet* 7:e1002001.
- Barakat TS, Loos F, van Staveren S, Myronova E, Ghazvini M, Grootegoed JA, Gribnau J. 2014. The trans-activator RNF12 and cis-acting elements effectuate X chromosome inactivation independent of X-pairing. *Mol Cell* 53:965–78. 8
- Beever C, Lai BPY, Baldry SEL, Peñaherrera MS, Jiang R, Robinson WP, Brown CJ. 2003. Methylation of ZNF261 as an assay for determining X chromosome inactivation patterns. *Am J Med Genet Part A* 120A:439–441.

- van den Berg IM, Laven JSE, Stevens M, Jonkers I, Galjaard R-J, Gribnau J, Hikke van Doorninck J. 2009. X Chromosome Inactivation Is Initiated in Human Preimplantation Embryos. *Am J Hum Genet* 84:771–779.
- Berletch JB, Ma W, Yang F, Shendure J, Noble WS, Disteché CM, Deng X. 2015. Escape from X Inactivation Varies in Mouse Tissues. *PLOS Genet* 11:e1005079.
- Berry-Kravis E, Potanos K, Weinberg D, Zhou L, Goetz CG. 2005. Fragile X–associated tremor/ataxia syndrome in sisters related to X-inactivation. *Ann Neurol* 57:144–147.
- Bertelsen B, Tümer Z, Ravn K. 2011. Three New Loci for Determining X Chromosome Inactivation Patterns. *J Mol Diagnostics* 13:537–540.
- Bicocchi MP, Migeon BR, Pasino M, Lanza T, Bottini F, Boeri E, Molinari AC, Corsolini F, Morerio C, Aquila M. 2005. Familial nonrandom inactivation linked to the X inactivation centre in heterozygotes manifesting haemophilia A. *Eur J Hum Genet* 13:635–640.
- Bittel DC, Theodoro MF, Kibiryeva N, Fischer W, Talebizadeh Z, Butler MG. 2008. Comparison of X-chromosome inactivation patterns in multiple tissues from human females. *J Med Genet* 45:309–313.
- Bland JM, Altman DG. 2010. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Int J Nurs Stud* 47:931–936.
- Boyd Y, Fraser NJ. 1990. Methylation patterns at the hypervariable X-chromosome locus DXS255 (M27 β): Correlation with X-inactivation status. *Genomics* 7:182–187.
- Brown CJ, Goss SJ, Lubahn DB, Joseph DR, Wilson EM, French FS, Willard HF. 1989. Androgen receptor locus on the human X chromosome: regional localization to Xq11-12 and description of a DNA polymorphism. *Am J Hum Genet* 44:264–269.
- Brown CJ, Hendrich BD, Rupert JL, Lafrenière RG, Xing Y, Lawrence J, Willard HF. 1992. The human XIST gene: Analysis of a 17 kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus. *Cell* 71:527–542.
- Brown CJ, Lafreniere RG, et al. 1991. Localization of the X Inactivation Centre on the Human X Chromosome in Xq13. *Nature* 349:82–84.

- Brown CJ, Willard HF. 1994. The human X-inactivation centre is not required for maintenance of X-chromosome inactivation. *Nature* 368:154–156.
- Buller RE, Sood AK, Lallas T, Buekers T, Skilling JS. 1999. Association Between Nonrandom X-Chromosome Inactivation and BRCA1 Mutation in Germline DNA of Patients With Ovarian Cancer. *J Natl Cancer Inst* 91 :339–346.
- Busque L, Paquette Y, Provost S, Roy D-C, Levine RL, Mollica L, Gilliland DG. 2009. Skewing of X-inactivation ratios in blood cells of aging women is confirmed by independent methodologies. *Blood* 113:3472–4.
- Carrel L, Willard HF. 2005. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature* 434:400–404.
- Clemson CM, Hall LL, Byron M, McNeil J, Lawrence JB. 2006. The X chromosome is organized into a gene-rich outer rim and an internal core containing silenced nongenic sequences. *Proc Natl Acad Sci* 103 :7688–7693.
- Clemson CM, McNeil J a., Willard HF, Lawrence JB. 1996. XIST RNA paints the inactive X chromosome at interphase: Evidence for a novel RNA involved in nuclear/chromosome structure. *J Cell Biol* 132:259–275.
- Cooke HJ, Brown WRA, Rappold GA. 1985. Hypervariable telomeric sequences from the human sex chromosomes are pseudoautosomal. *Nature* 317:687–692.
- Costanzi C, Pehrson JR. 1998. Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature* 393:599–601.
- Cotton AM, Ge B, Light N, Adoue V, Pastinen T, Brown CJ. 2013. Analysis of expressed SNPs identifies variable extents of expression from the human inactive X chromosome. *Genome Biol* 14:R122.
- van Dijk JP, Heuver LH, van der Reijden BA, Raymakers RA, de Witte T, Jansen JH. 2002. A Novel, Essential Control for Clonality Analysis with Human Androgen Receptor Gene Polymerase Chain Reaction. *Am J Pathol* 161:807–812.
- Dobyns WB, Filauro A, Tomson BN, Chan AS, Ho AW, Ting NT, Oosterwijk JC, Ober C.

2004. Inheritance of most X-linked traits is not dominant or recessive, just X-linked. *Am J Med Genet Part A* 129A:136–143.
- Echevarria L, Benistan K, Toussaint a, Dubourg O, Hagege a a, Eladari D, Jabbour F, Beldjord C, De Mazancourt P, Germain DP. 2015. X-chromosome inactivation in female patients with Fabry disease. *Clin Genet* 1–11.
- Elstein D, Schachamov E, Beer R, Altarescu G. 2012. X-inactivation in Fabry disease. *Gene* 505:266–8.
- Engelen M, Barbier M, Dijkstra IME, Schür R, de Bie RMA, Verhamme C, Dijkgraaf MGW, Aubourg PA, Wanders RJA, van Geel BM, de Visser M, Poll-The BT, Kemp S. 2014. X-linked adrenoleukodystrophy in women: a cross-sectional cohort study. *Brain* 137:693–706.
- Engreitz JM, Pandya-Jones A, McDonel P, Shishkin A, Sirokman K, Surka C, Kadri S, Xing J, Goren A, Lander ES, Plath K, Guttman M. 2013. The Xist lncRNA exploits three-dimensional genome architecture to spread across the X-chromosome. *Science* 341:1237973.
- Fang J, Chen T, Chadwick B, Li E, Zhang Y. 2004. Ring1b-mediated H2A Ubiquitination Associates with Inactive X Chromosomes and Is Involved in Initiation of X Inactivation. *J Biol Chem* 279 :52812–52815.
- Ferguson-Smith M a. 1965. Karyotype-Phenotype Correlations in Gonadal Dysgenesis and Their Bearing on the Pathogenesis of Malformations. *J Med Genet* 2:142–155.
- Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL. 1992. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci* 89 :1827–1831.
- Ghezzi D, Sevrioukova I, Invernizzi F, Lamperti C, Mora M, D’Adamo P, Novara F, Zuffardi O, Uziel G, Zeviani M. 2010. Severe X-linked mitochondrial encephalomyopathy associated with a mutation in apoptosis-inducing factor. *Am J Hum Genet* 86:639–49.
- Giavarina D. 2015. Understanding Bland Altman analysis. *Biochem medica* 25:141–51.

- Giovannucci E, Stampfer MJ, Krithivas K, Brown M, Brufsky A, Talcott J, Hennekens CH, Kantoff PW. 1997. The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci* 3320–3323.
- Gribnau J, Luikenhuis S, Hochedlinger K, Monkhorst K, Jaenisch R. 2005. X chromosome choice occurs independently of asynchronous replication timing. *J Cell Biol* 168 :365–373.
- Grutzner F, Rens W, Tsend-Ayush E, El-Mogharbel N, O’Brien PCM, Jones RC, Ferguson-Smith MA, Marshall Graves JA. 2004. In the platypus a meiotic chain of ten sex chromosomes shares genes with the bird Z and mammal X chromosomes. *Nature* 432:913–917.
- Guillén-Navarro E, Domingo-Jiménez MR, Alcalde-Martín C, Cancho-Candela R, Couce ML, Galán-Gómez E, Alonso-Luengo O. 2013. Clinical manifestations in female carriers of mucopolysaccharidosis type II: a Spanish cross-sectional study. *Orphanet J Rare Dis* 8:92.
- Hall LL, Byron M, Sakai K, Carrel L, Willard HF, Lawrence JB. 2002. An ectopic human XIST gene can induce chromosome inactivation in postdifferentiation human HT-1080 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8677–8682.
- Hatakeyama C, Anderson CL, Beever CL, Peñaherrera MS, Brown CJ, Robinson WP. 2004. The dynamics of X-inactivation skewing as women age. *Clin Genet* 66:327–32.
- Hendriks RW, Chen Z-Y, Hinds H, Schuurman RKB, Craig IW. 1992. An X chromosome inactivation assay based on differential methylation of a CpG island coupled to a VNTR polymorphism at the 5’ end of the monoamine oxidase A gene. *Hum Mol Genet* 1 :187–194.
- Hook EB, Warburton D, Lemli L, Smith DW. 1983. The distribution of chromosomal genotypes associated with Turner’s syndrome: livebirth prevalence rates and evidence for diminished fetal mortality and severity in genotypes associated with structural X abnormalities or mosaicism. *Hum Genet* 64:24–27.
- de Hoon EB, Monkhorst K, Riegman P, Laven JSE, Gribnau J. 2015. Buccal swab as a reliable predictor for X inactivation ratio in inaccessible tissues. *J Med Genet* 1–7.

- Chadwick BP, Willard HF. 2001. Histone H2A variants and the inactive X chromosome: identification of a second macroH2A variant. *Hum Mol Genet* 10 :1101–1113.
- Chang SC, Brown CJ. 2010. Identification of regulatory elements flanking human XIST reveals species differences. *BMC Mol Biol* 11:20.
- Chaumeil J, Okamoto I, Guggiari M, Heard E. 2002. Integrated kinetics of X chromosome inactivation in differentiating embryonic stem cells. *Cytogenet Genome Res* 99:75–84.
- Chen GL, Prchal JT. 2007. X-linked clonality testing: interpretation and limitations. *Blood* 110:1411–1419.
- Christensen BC, Houseman EA, Marsit CJ, Zheng S, Wrensch MR, Wiemels JL, Nelson HH, Karagas MR, Padbury JF, Bueno R, Sugarbaker DJ, Yeh R-F, Wiencke JK, Kelsey KT. 2009. Aging and Environmental Exposures Alter Tissue-Specific DNA Methylation Dependent upon CpG Island Context. *PLoS Genet* 5:e1000602.
- Chureau C, Chantalat S, Romito A, Galvani A, Duret L, Avner P, Rougeulle C. 2011. Ftx is a non-coding RNA which affects Xist expression and chromatin structure within the X-inactivation center region. *Hum Mol Genet* 20:705–18.
- Jegalian K, Page DC. 1998. A proposed path by which genes common to mammalian X and Y chromosomes evolve to become X inactivated. *Nature* 394:776–780.
- Jonkers I, Barakat TS, Achame EM, Monkhorst K, Kenter A, Rentmeester E, Grosveld F, Grootegoed JA, Gribnau J. 2009. RNF12 is an X-Encoded dose-dependent activator of X chromosome inactivation. *Cell* 139:999–1011.
- Kouzarides T. 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell* 128:693–705.
- Kristiansen M, Knudsen GPS, Maguire P, Margolin S, Pedersen J, Lindblom A, Ørstavik KH. 2005. High incidence of skewed X chromosome inactivation in young patients with familial non-BRCA1/BRCA2 breast cancer. *J Med Genet* 42 :877–880.
- Kubota T, Nonoyama S, Tonoki H, Masuno M, Imaizumi K, Kojima M, Wakui K, Shimadzu M, Fukushima Y. 1999. A new assay for the analysis of X-chromosome inactivation based on methylation-specific PCR. *Hum Genet* 104:49–55.

- Lee J, Davidow LS, Warshawsky D. 1999. Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre. *Nat Genet* 21:400.
- Lee JT. 2003. Molecular Links between X-Inactivation and Autosomal Imprinting : X-Inactivation as a Driving Force for the Evolution of Imprinting ? *Curr Biol* 13:242–254.
- Lengner CJ, Gimelbrant A a, Erwin J a, Cheng AW, Guenther MG, Welstead GG, Alagappan R, Frampton GM, Xu P, Muffat J, Santagata S, Powers D, Barrett CB, Young R a, Lee JT, Jaenisch R, Mitalipova M. 2010. Derivation of pre-X inactivation human embryonic stem cells under physiological oxygen concentrations. *Cell* 141:872–83.
- Livernois AM, Waters SA, Deakin JE, Marshall Graves JA, Waters PD. 2013. Independent Evolution of Transcriptional Inactivation on Sex Chromosomes in Birds and Mammals. *PLoS Genet* 9:e1003635.
- Luikenhuis S, Wutz A, Jaenisch R. 2001. Antisense transcription through the Xist locus mediates Tsix function in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 21:8512–20.
- Lyon MF. 1961. Gene Action in the X-chromosome of the Mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* 190:372–373.
- Lyon MF. 1962. Sex chromatin and gene action in the mammalian X-chromosome. *Am J Hum Genet* 14:135–148.
- Lyon MF. 1998. X-Chromosome inactivation: a repeat hypothesis. *Cytogenet Genome Res* 80:133–137.
- Mahadevaiah SK, Royo H, VandeBerg JL, McCarrey JR, Mackay S, Turner JMA. 2009. Key Features of the X Inactivation Process Are Conserved between Marsupials and Eutherians. *Curr Biol* 19:1478–1484.
- Machado FB, Machado FB, Faria MA, Lovatel VL, Alves Da Silva AF, Radic CP, De Brasi CD, Rios ÁFL, Chuva De Sousa Lopes SM, Serafim Da Silveira L, Ruiz-Miranda CR, Ramos ES, Medina-Acosta E. 2014. 5meCpG epigenetic marks neighboring a primate-conserved core promoter short tandem repeat indicate X-chromosome inactivation. *PLoS One* 9:1–13.

- Maier EM, Kammerer S, Muntau AC, Wichers M, Braun A, Roscher A a. 2002. Symptoms in carriers of adrenoleukodystrophy relate to skewed X inactivation. *Ann Neurol* 52:683–8.
- Majer F, Vlaskova H, Krol L, Kalina T, Kubanek M, Stolnaya L, Dvorakova L, Elleder M, Sikora J. 2012. Danon disease: A focus on processing of the novel LAMP2 mutation and comments on the beneficial use of peripheral white blood cells in the diagnosis of LAMP2 deficiency. *Gene* 498:183–195.
- Maroni G, Kaplan R, Plaut W. 1974. RNA synthesis in *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes indications of simultaneous dosage compensation and dosage effect in X chromosomes. *Chromosoma* 47:203–212.
- Melamed E, Arnold AP. 2007. Regional differences in dosage compensation on the chicken Z chromosome. *Genome Biol* 8:R202–R202.
- Meyer BJ, Casson LP. 1986. *Caenorhabditis elegans* compensates for the difference in X chromosome dosage between the sexes by regulating transcript levels. *Cell* 47:871–881.
- Migeon B. 2014. *Females Are Mosaics: X Inactivation and Sex Differences in Disease*. OUP USA.
- Migeon BR, Chowdhury a K, Dunston J a, McIntosh I. 2001. Identification of TSIX, encoding an RNA antisense to human XIST, reveals differences from its murine counterpart: implications for X inactivation. *Am J Hum Genet* 69:951–60.
- Migeon BR, Lee CH, Chowdhury AK, Carpenter H. 2002. Species differences in TSIX/Tsix reveal the roles of these genes in X-chromosome inactivation. *Am J Hum Genet* 71:286–293.
- Monkhorst K, Jonkers I, Rentmeester E, Grosveld F, Gribnau J. 2008. X Inactivation Counting and Choice Is a Stochastic Process: Evidence for Involvement of an X-Linked Activator. *Cell* 132:410–421.
- Moreira de Mello JC, de Araújo ESS, Stabellini R, Fraga AM, de Souza JES, Sumita DR, Camargo A a, Pereira L V. 2010. Random X inactivation and extensive mosaicism in human placenta revealed by analysis of allele-specific gene expression along the X

- chromosome. PLoS One 5:e10947.
- Moschese V, Orlandi P, Plebani A, Arvanitidis K, Fiorini M, Speletas M, Mella P, Ritis K, Sideras P, Finocchi A, Livadiotti S, Rossi P. 2000. X-chromosome inactivation and mutation pattern in the Bruton's tyrosine kinase gene in patients with X-linked agammaglobulinemia. Italian XLA Collaborative Group. Mol Med 6:104–113.
- Mossner M, Nolte F, Hütter G, Reins J, Klaumünzer M, Nowak V, Obländer J, Ackermann K, Will S, Röhl H, Neumann U, Neumann M, Hopfer O, Baldus CD, Hofmann W-K, Nowak D. 2013. Skewed X-inactivation patterns in ageing healthy and myelodysplastic haematopoiesis determined by a pyrosequencing based transcriptional clonality assay. J Med Genet 50:108–17.
- Musalkova D, Minks J, Storkanova G, Dvorakova L, Hrebicek M. 2015. Identification of novel informative loci for DNA-based X-inactivation analysis. Blood Cells Mol Dis 54:210–6.
- Okamoto I, Otte AP, Allis CD, Reinberg D, Heard E. 2004. Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. Science 303:644–9.
- Okamoto I, Patrat C, Thépot D, Peynot N, Fauque P, Daniel N, Diabangouaya P, Wolf J-P, Renard J-P, Duranthon V, Heard E. 2011. Eutherian mammals use diverse strategies to initiate X-chromosome inactivation during development. Nature 472:370–374.
- Ørstavik KH, Scheibel E, Ingerslev J, Schwartz M. 2000. Absence of Correlation between X Chromosome Inactivation Pattern and Plasma Concentration of Factor VIII and Factor IX in Carriers of Haemophilia A and B. Thromb Haemost 83:433–437.
- Plenge RM, Hendrich BD, Schwartz C, Arena JF, Naumova A, Sapienza C, Winter RM, Willard HF. 1997. A promoter mutation in the XIST gene in two unrelated families with skewed X-chromosome inactivation. Nat Genet 17:353–356.
- Plenge RM, Stevenson RA, Lubs HA, Schwartz CE, Willard HF. 2002. Skewed X-chromosome inactivation is a common feature of X-linked mental retardation disorders. Am J Hum Genet 71:168–73.
- Rastan S, Robertson EJ. 1985. X-chromosome deletions in embryo-derived (EK) cell lines

- associated with lack of X-chromosome inactivation. *Development* 90:379–388.
- Rego A, Sinclair PB, Tao W, Kireev I, Belmont AS. 2008. The facultative heterochromatin of the inactive X chromosome has a distinctive condensed ultrastructure. *J Cell Sci* 121:1119–1127.
- Reik W, Lewis A. 2005. Co-evolution of X-chromosome inactivation and imprinting in mammals. *Nat Rev Genet* 6:403–10.
- Rougeulle C, Chaumeil J, Sarma K, Allis CD, Reinberg D, Avner P, Heard E. 2004. Differential Histone H3 Lys-9 and Lys-27 Methylation Profiles on the X Chromosome. *Mol Cell Biol* 24 :5475–5484.
- Řeboun M, Rybová J, Dobrovolný R, Včelák J, Veselková T, Štorkánová G, Mušálková D, Hřebíček M, Ledvinová J, Magner M, Zeman J, Pešková K, Dvořáková L. 2016. X-Chromosome Inactivation Analysis in Different Cell Types and Induced Pluripotent Stem Cells Elucidates the Disease Mechanism in a Rare Case of Mucopolysaccharidosis Type II in a Female. *Folia Biol (Praha)* 62:82–89 (v tisku).
- Sado T, Hoki Y, Sasaki H. 2005. Tsix silences Xist through modification of chromatin structure. *Dev Cell* 9:159–65.
- Sandovici I, Naumova AK, Leppert M, Linares Y, Sapienza C. 2004. A longitudinal study of X-inactivation ratio in human females. *Hum Genet* 115:387–92.
- Shapiro LJ, Mohandas T, Weiss R, Romeo G. 1979. Non-Inactivation of an X-Chromosome Locus in Man. *Science* 204:1224–1226.
- Sharp A, Robinson D, Jacobs P. 2000. Age- and tissue-specific variation of X chromosome inactivation ratios in normal women. *Hum Genet* 107:343–349.
- Sharp AJ, Stathaki E, Migliavacca E, Brahmachary M, Montgomery SB, Dupre Y, Antonarakis SE. 2011. DNA methylation profiles of human active and inactive X chromosomes. *Genome Res* 21:1592–600.
- Schmidt M, Migeon BR. 1990. Asynchronous replication of homologous loci on human active and inactive X chromosomes. *Proc Natl Acad Sci* 87 :3685–3689.

- Schmidt M, Du Sart D. 1992. Functional disomies of the X chromosome influence the cell selection and hence the X inactivation pattern in females with balanced X-autosome translocations: a review of 122 cases. *Am J Med Genet* 42:161–169.
- Soltanzadeh P, Friez MJ, Dunn D, von Niederhausen A, Gurvich OL, Swoboda KJ, Sampson JB, Pestronk A, Connolly AM, Florence JM, Finkel RS, Bönnemann CG, Medne L, Mendell JR, Mathews KD, Wong BL, Sussman MD, Zonana J, Kovak K, Gospe SM, Gappmaier E, Taylor LE, Howard MT, Weiss RB, Flanigan KM. 2010. Clinical and Genetic Characterization of Manifesting Carriers of DMD Mutations. *Neuromuscul Disord* 20:499–504.
- Spada AR La, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE, Fischbeck KH. 1991. Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 352:77–79.
- Spencer JA, Sinclair AH, Watson JM, Marshall Graves JA. 1991. Genes on the short arm of the human X chromosome are not shared with the marsupial X. *Genomics* 11:339–345.
- Storkanova G, Vlaskova H, Chuzhanova N, Zeman J, Stranecky V, Majer F, Peskova K, Luksan O, Jirsa M, Hrebicek M, Dvorakova L. 2013. Ornithine carbamoyltransferase deficiency: molecular characterization of 29 families. *Clin Genet* 84:552–9.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397:441–446.
- Swierczek SI, Agarwal N, Nussenzweig RH, Rothstein G, Wilson A, Artz A, Prchal JT. 2008. Hematopoiesis is not clonal in healthy elderly women. *Blood* 112:3186–93.
- Swierczek SI, Piterkova L, Jelinek J, Agarwal N, Hammoud S, Wilson A, Hickman K, Parker CJ, Cairns BR, Cairns B, Prchal JT. 2012. Methylation of AR locus does not always reflect X chromosome inactivation state. *Blood* 119:e100–9.
- Takada H, Kanegane H, Nomura A, Yamamoto K, Ihara K, Takahashi Y, Tsukada S, Miyawaki T, Hara T. 2004. Female agammaglobulinemia due to the Bruton tyrosine kinase deficiency

- caused by extremely skewed X-chromosome inactivation. *Blood* 103:185–187.
- Tattermusch A, Brockdorff N. 2011. A scaffold for X chromosome inactivation. *Hum Genet* 130:247–253.
- Tian D, Sun S, Lee JT. 2010. The long noncoding RNA, Jpx, is a molecular switch for X chromosome inactivation. *Cell* 143:390–403.
- Vallot C, Huret C, Lesecque Y, Resch A, Oudrhiri N, Bennaceur-Griscelli A, Duret L, Rougeulle C. 2013. XACT, a long noncoding transcript coating the active X chromosome in human pluripotent cells. *Nat Genet* 45:239–241.
- Veyrunes F, Waters PD, Miethke P, Rens W, McMillan D, Alsop AE, Grützner F, Deakin JE, Whittington CM, Schatzkamer K, Kremitzki CL, Graves T, Ferguson-Smith M a., Warren W, Marshall Graves J a. 2008. Bird-like sex chromosomes of platypus imply recent origin of mammal sex chromosomes. *Genome Res* 18:965–973.
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Preisinger AC, Willard HF, Michelson AM, Riggs AD, Orkin SH. 1987. Clonal Analysis Using Recombinant DNA Probes from the X-Chromosome. *Cancer Res* 47 :4806–4813.
- Woodfine K, Fiegler H, Beare DM, Collins JE, McCann OT, Young BD, Debernardi S, Mott R, Dunham I, Carter NP. 2004. Replication timing of the human genome. *Hum Mol Genet* 13 :191–202.
- Yang C, Chapman AG, Kelsey AD, Minks J, Cotton AM, Brown CJ. 2011. X-chromosome inactivation: molecular mechanisms from the human perspective. *Hum Genet* 130:175–185.
- Yang F, Babak T, Shendure J, Yang F, Babak T, Shendure J, Disteche CM. 2010. Global survey of escape from X inactivation by RNA-sequencing in mouse Global survey of escape from X inactivation by RNA-sequencing in mouse. *Genome Res* 20:614–622.
- Yorifuji T, Muroi J, Uematsu a, Tanaka K, Kiwaki K, Endo F, Matsuda I, Nagasaka H, Furusho K. 1998. X-inactivation pattern in the liver of a manifesting female with ornithine transcarbamylase (OTC) deficiency. *Clin Genet* 54:349–353.

- Yoshioka M, Yorifuji T, Mituyoshi I. 1998. Skewed X inactivation in manifesting carriers of Duchenne muscular dystrophy. *Clin Genet* 53:102–107.
- Zhang J, Xu F, Hashimshony T, Keshet I, Cedar H. 2002. Establishment of transcriptional competence in early and late S phase. *Nature* 420:198–202.
- Zhang Y, Castillo-Morales A, Jiang M, Zhu Y, Hu L, Urrutia AO, Kong X, Hurst LD. 2013. Genes that escape X-inactivation in humans have high intraspecific variability in expression, are associated with mental impairment but are not slow evolving. *Mol Biol Evol* 30:2588–2601.

Internetové zdroje

- URL1 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/44416/> > citováno 1. 4. 2016
- URL2 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/92619/> > citováno 1. 4. 2016
- URL3 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/92316/> > citováno 1. 4. 2016
- URL4 <<https://www.neb.com/products/r0171-hpaii>> citováno 2. 2. 2016

8 Přílohy

Příloha 1: Tabulka výsledků pro první měření každou metodou

Hodnoty stanovené prvním měřením pro každou z metod, 0 % – náhodné rozložení X inaktivace, 50 % – zcela zešíkmená X inaktivace, x – neinformativní metoda, - netestováno

žena	AR (%)	RP2 (%)	CNKS2 (%)	LAMP2 (%)	IDS (%)	ABCD1 (%)
F1	24	24	x	-	20	-
F2	20	-	x	-	11	x
F3	x	0	4	14	x	-
F4	5	1	x	0	x	-
F5	18	25	29	x	28	-
F6	40	46	x	x	35	37
F7	30	39	x	x	29	32
F8	33	x	x	23	x	17
F9	x	7	x	x	20	25
F10	44	x	x	50	x	-
F11	x	-	x	15	11	x
F12b	x	3	7	-	-	-
F13	37	x	-	41	x	-
F14	46	50	49	48	x	50
F15	x	30	17	-	-	-
F16	18	22	x	24	x	-
F17	0	6	x	x	-	-
F18	3	6	x	-	6	-
F19	36	41	x	-	-	-
F20	41	x	x	41	-	-
F21	x	3	2	-	-	-
F22	5	x	x	-	-	-
F23a	38	34	x	x	-	-
F24	x	21	x	21	-	x
F25	22	x	x	-	-	-
F26	x	42	x	-	-	-
F27	29	16	x	x	x	x
F28	34	41	x	x	-	-
F29	x	15	x	-	-	-
F30	x	19	x	-	-	-
F31	x	21	x	-	-	-

F32	15	x	x	-	-	-
F33	6	x	x	-	-	-
F34	13	12	x	-	-	-
F35	31	x	x	-	-	-
F36	5	x	x	-	-	-
F37	25	x	x	-	-	-
F38	5	x	x	4	x	-
F39	35	40	x	x	36	-
F40	10	3	x	-	-	-
F41	x	23	x	-	-	-
F42	49	50	x	50	-	-
F43	49	x	x	49	x	-
F44	x	31	x	24	x	-
F45	43	45	x	41	x	-
F46	x	24	x	x	x	x
F47	0	7	27	-	-	-
F48	8	15	x	-	-	-
F49	x	x	x	49	x	x
F50	49	x	x	50	50	-
F51	36	32	x	x	x	-
F52	x	37	x	-	-	-
F53	x	x	x	40	-	x
F54	31	44	42	-	-	-

Příloha 2: Hodnoty opakovaných měření pro stanovení koeficientů opakovatelnosti

Hodnoty opakovaných měření pro lokus *AR*, hodnota udává procento inaktivace kratší alely

žena	první měření (%)	druhé měření (%)
F14	4	2
F23b	77	82
F25	72	59
F27	21	28
F28	16	18
F32	35	32
F33	56	55
F35	19	19
F36	45	45
F37	25	23
F38	45	47
F50	99	99

Hodnoty opakovaných měření pro lokus *RP2*, hodnota udává procento inaktivace kratší alely

žena	první měření (%)	druhé měření (%)
F23a	84	81
F26	8	9
F27	66	60
F28	9	12
F29	35	34
F30	31	37
F31	71	69
F40	53	57
F41	73	73
F46	74	73

Hodnoty opakovaných měření pro polymorfismus *LAMP2* c.156A>T, hodnota udává procento transkriptu s variantou A

žena	první měření (%)	druhé měření (%)
F4	50	49
F8	73	77
F11	65,5	62
F13	9	9
F14	2	0
F16	25,5	28
F20	91	90,5
F24	71,5	68,5
F43	99,5	99,5
F44	74,5	75
F45	91	88,5

Hodnoty opakovaných měření pro polymorfismus *IDS* c.438C>T, hodnota udává procento transkriptu s variantou C

žena	první měření (%)	druhé měření (%)
F1	70	72
F2	39	38
F5	78	78
F6	85	83
F9	70	71
F11	39	41,5
F12a	23	24
F18	56	56
F39	86	86

Příloha 3: Protokol stanovení haplotypů

Chemikálie

sada Elucigene QST*Rplusv2

- reakční směs

Hi-Di formamid Applied Biosystems, USA

GeneScan 500 ROX, Applied Biosystems, USA

voda z Direct-Q systému, Millipore

Postup

1. K analýze byla použita DNA izolovaná pomocí sady od firmy Qiagen podle protokolu uvedeném v kapitole 3.2.1.
2. Přípravu PCR směsi jsme prováděli v laminární boxu. Výrobce dodanou reakční směs jsme rozpipetovali do zkumavek po 10 μ l.
3. Poté jsme do každé zkumavky přidali 2,5 μ l testované DNA a promíchali pipetováním a krátce stočili.
4. Současně se sérií vzorků jsme připravili i vzorek kontrolní, ve kterém byl objem DNA nahrazen vodou.
5. Připravené vzorky jsme vložili do termocykleru (DNA Engine Dyad, BioRad) a DNA amplifikovali při podmínkách podle tabulka 19.

Tab. 19: Podmínky PCR pro vzorky připravované sadou Elucigene QST®Rplusv2

teplota (°C)	čas (s)	26x
95	900	
95	30	
59	90	
72	90	
72	1800	

6. Následně jsme vzorky připravovali na kapilární elektroforézu.
7. Smícháním 250 μ l Hi-Di formamidu s 6,85 μ l standardu délky GeneScan 500 ROX a rozpipetovali po 15 μ l na mikrotitrační destičku.
8. Každé jamky jsme přidali po 3 μ l vzorku po PCR.
9. Vzorky jsme denaturovali v termocykleru při 94 °C po 3 minuty a poté inkubovali při 4 °C po 30s.
10. Destičku jsme krátce centrifugovali a následně vložili k analýze do přístroje 3500xL Genetic Analyzer, Applied Biosystems.
11. Analýzu výsledků jsme prováděli v programu GeneMapper 5.